LPS-INDUZIERTE PROSTAGLANDINSYNTHESE VON MAKROPHAGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Ulrich Schade
aus Rottenburg

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545304_0023

LPS-INDUZIERTE PROSTAGLANDINSYNTHESE VON MAKROPHAGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Ulrich Schade
aus Rottenburg

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. H. Mohr
Leiter der Arbeit:	Doz. Dr. E.Th. Rietschel
Referent:	Doz. Dr. E.Th. Rietschel
Koreferent:	Prof. Dr. R. Hausmann

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses:

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

U. Schade, H. Fischer, M.L. Lohmann-Matthes, B. Peskar and E.Th. Rietschel
LIPID A INDUCED PROSTAGLANDIN SYNTHESIS IN MACROPHAGES
4. Europ. Immunol. Meeting Budapest 1978 Postervortrag (Abstract 105)

E.Th. Rietschel, G.G. Greer, M. Jensen, U. Schade und Z. Sidorczyk
STRUKTUR UND WIRKUNG BAKTERIELLER LIPOPOLYSACCHARIDE
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28, 1203 (1978)

B.A. Peskar, U. Schade, E.Th. Rietschel and B.M. Peskar
SYNTHESIS AND METABOLISM OF ENDOGENOUS PROSTAGLANDINS BY HUMAN GASTRIC MUCOSA
International Conference on Prostaglandins Washington D.C. May 1979 Postervortrag

U. Schade and E.Th. Rietschel
DIFFERENCES IN LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED PROSTAGLANDIN-RELEASE AND PHAGOCYTOSIS CAPACITY OF PERITONEAL MACROPHAGES FROM LPS-HYPERREACTIVE AND TOLERANT MICE
In: Abstracts of the 6th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins Uppsala, August 1979 (Postervortrag)
TOXICON 17, Supplement No. 1 (1979)

U. Schade and E.Th. Rietschel
DIFFERENCES IN LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED PROSTAGLANDIN-RELEASE AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES FROM LPS-HYPERREAKTIVE AND TOLERANT MICE
In: Natural Toxins. Invited Papers and Workshop from the 6th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins Uppsala, August 1979 (D. Eaker and T. Wadström, ed.) Pergamon Press

E.Th. Rietschel, U. Schade, O. Lüderitz, H. Fischer and B.A. Peskar
PROSTAGLANDINS IN ENDOTOXICOSIS
In: Microbiology-1980 (D. Schlessinger, ed.) Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg in der Abteilung von Dr. Lüderitz unter der Leitung von Herrn Dozent Dr. E.Th. Rietschel durchgeführt, dem ich für seine weit über die Pflicht des Anleitenden hinausgehende freundschaftliche Hilfe, ohne die die vorliegende Arbeit nicht hätte zustande kommen können, zu besonderem Dank verpflichtet bin.

Herrn Prof. Dr. Fischer danke ich für die Überlassung des Themas der Arbeit sowie für viele experimentelle Vorschläge und stimulierende Diskussionen. Herrn Dr. Lüderitz danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie für viele Anregungen und hilfreiche Unterstützung in der Zeit meiner Doktorarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Doz. Dr. Peskar (Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg) für die Möglichkeit in seinem Labor den Radioimmunassay für Prostaglandine erlernen zu können, für seinen ständigen fachmännischen Ratschlag und für die freundliche Bereitstellung von Antiseren und Prostaglandinen.

Herrn Prof. Dr. Staudinger bin ich für unterstützende Diskussionen und kritische Hilfe zu Dank verpflichtet.

Für die stetige Versorgung mit Mäusen danke ich Herrn Dr. Mossmann.

Für die freundliche Bereitstellung von Knochenmarkmakrophagen danke ich Frau Doz. Dr. M.L. Lohmann-Matthes.

Herrn Dr. C. Galanos möchte ich für die freundliche Überlassung von elektrodialysiertem LPS danken.

Herrn Dr. S. Schlecht danke ich für die Bereitstellung von Bakterien aus denen die verwendeten Lipopolysaccharide extrahiert wurden.

Herrn Schmitz danke ich für die Granulozyten aus Rindern.

Für die einführende Hilfe in den Phagozytosetest und die Bereitstellung von fluoreszenzmarkiertem Zymosan danke ich Frau R.L. Oropeza-Rendon.

Für ihre ausgezeichnete Hilfe und einfallsreiche Unterstützung bei vielen Experimenten danke ich Frau Pflugfelder.

Für die Ausführung zahlloser Radioimmunassays, ihrer Hilfe mit den Mäusen und für LPS-Extraktionen danke ich Frau Strohmeier.

Für technische Hilfe möchte ich weiterhin Herrn Beck danken.

Für die Fertigstellung der Druckvorlage danke ich ganz herzlich Frau R. Schneider. Für die Anfertigung von Zeichnungen und die Ausführung der Fotoarbeiten möchte ich Frau Kochanowski und Frau L. Lay danken.

Herrn Borowiak jr. möchte ich ganz herzlich für seine einsatzbereite Hilfe bei den vorbereitenden Arbeiten zum Aufbau einer massenspektrometrischen Analytik der Prostaglandine danken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Lüderitz danke ich für die stets harmonische Zusammenarbeit und ganz besonders für viele freundschaftlich verbrachte Stunden in und ausserhalb des Labors.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Stiftung Volkswagenwerk.

Zuletzt geht mein Dank an ungezählte Mäuse des NMRI-Stammes, deren Makrophagen durch unablässige Produktion von Prostaglandinen Grundlegendes zu dieser Arbeit beisteuerten.

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1.	Zielsetzung der Arbeit und Zusammenfassung	1
2.	**EINLEITUNG**	10
2.1.	Struktur und Funktion bakterieller Endotoxine	10
2.2.	Prostaglandine, Struktur, Biosynthese, Metabolismus und biologische Wirkung	14
2.3.	Quantitative und Qualitative Analyse von Prostaglandinen	18
2.3.1.	Radioimmunassay	18
2.3.2.	Gaschromatographie	24
2.4.	Prostaglandine als Mediatoren von LPS-Wirkungen	27
2.5.	Die Rolle der Makrophagen bei LPS-Wirkungen	28
3.	**MATERIAL UND METHODEN**	31
3.1.	Kulturmedien und Puffer	31
3.2.	LPS, bakterielle Proteine und Zymosan	32
3.3.	Fettsäuren, Prostaglandine, Indomethacin	34
3.4.	Tiere	35
3.5.	Induktion von LPS-Hyperreaktivität und LPS-Toleranz	35
3.6.	Gewinnung von Makrophagen	36
3.7.	Gewinnung von Milzzellen aus der Maus	37
3.8.	Granulozyten vom Rind	38
3.9.	Inkubation der Zellen mit LPS	38
3.10.	Inkubation der Zellen mit Zymosan	39
3.11.	Färbemethoden	39
3.11.1.	Anfärbung mit Trypanblau; Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von LPS auf Makrophagen	39
3.11.2.	Anfärbung nach Giemsa	40
3.12.	Bestimmung der Phagozytosekapazität von Makrophagen	40
3.13.	Enzymatische Bestimmungen	42
3.13.1.	Lactatdehydrogenase	42
3.13.2.	β-N-Acetyl-D-Glucosaminidase	42
3.14.	Gewinnung und Vorreinigung von Prostaglandinen aus Überständen von Makrophagenkulturen	43
3.14.1.	Extraktionsmethoden	43
3.14.2.	Flüssigkeitschromatographie	45
3.14.2.1.	Chromatographie an Kieselsäure	45

3.14.2.2.	Chromatographie an Sephadex LH 20	46
3.15.	Derivate für die Gaschromatographie	48
3.15.1.	Prostaglandin-Methylester	48
3.15.2.	Oximierung der Prostaglandin-Methylester	49
3.15.3.	Trimethylsilylierung der oximierten Prostaglandin-Methylester	49
3.16.	Gaschromatographie	50
3.16.1.	Gepackte Säulen	50
3.16.2.	Glaskapillarsäulen	52
3.16.3.	Injektionsverfahren	53
3.16.4.	Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen	57
3.16.5.	Charakterisierung der flüssigen Phasen	58
3.16.6.	Identifikation der Prostaglandine in der gaschromatographischen Analyse	58
3.16.7.	Quantitative Bestimmung der Prostaglandine in der gaschromatographischen Analyse	60
3.17.	Radioimmunassay	60
3.17.1	Antiseren	60
3.17.2.	Radioaktive Prostaglandine	62
3.17.3.	Durchführung des Radioimmunassay	62
4.	**ERGEBNISSE**	63
4.1.	Lipopolysaccharid - induzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen	63
4.1.1.	Versuche mit Knochenmarkmakrophagen	63
4.1.1.1.	Das aktive Prinzip	64
4.1.1.2.	Abhängigkeit der LPS-induzierten PG-Produktion von Inkubationszeit, Zellzahl und LPS-Dosis	66
4.1.1.3.	Toxische Wirkungen von LPS auf Knochenmarkmakrophagen	69
4.1.1.4.	Einfluss von Indomethacin und Arachidonsäure auf die LPS - induzierte PG-Synthese von Knochenmarkmakrophagen	71
4.1.2.	Versuche mit Peritonealmakrophagen	71
4.1.2.1.	LPS - induzierte PG-Synthese von Peritonealmakrophagen	72
4.1.2.2.	Abhängigkeit der LPS - induzierten PG-Synthese von der Inkubationsdauer	74
4.1.2.3.	Abhängigkeit der LPS - induzierten PG-Synthese von der Zellzahl	75
4.1.2.4.	Abhängigkeit der LPS - induzierten PG-Synthese von der LPS-Dosis	76
4.1.2.5.	Abhängigkeit der LPS - induzierten PG-Synthese vom Alter der Mäuse	78

4.1.2.6. Abhängigkeit der LPS - induzierten PG-Synthese vom Mäusestamm 79
4.1.2.7. Prostaglandin induzierende Wirkungen von chemisch und modifizierten Lipopolysacchariden, freiem Lipoid A und bakteriellen Proteinen 80
4.1.2.8. Inkubation von Makrophagen mit Fettsäuren 83
4.1.2.9. Induktion der PG-Synthese in Peritonealmakrophagen mit Zymosan 86
4.2. Vergleich der Wirkungen von LPS und Zymosan auf die Aktivität des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase und des Cytoplasmatischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase 86
4.3. LPS-Stimulation anderer Zellen des Retikuloendothelialen Systems 87
4.4. Versuche mit Makrophagen aus hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen 89
4.4.1. LPS - induzierte PG-Synthese in Makrophagen aus LPS - hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen 91
4.4.2. Zymosan - induzierte PG-Synthese von Makrophagen aus LPS-hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen 93
4.4.3. LPS - induzierte PG-Synthese von Makrophagen aus toleranten Mäusen in Gegenwart von "Conditioned Medium" 95
4.4.4. Cytotoxische Wirkung von LPS auf Makrophagen aus LPS-hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen 97
4.4.5. Funktioneller Vergleich von Makrophagen aus LPS-hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen (Phagozytose von Zymosan) 99
4.5. Analyse von Prostaglandinen in Makrophagenüberständen mit Hilfe der Gaschromatographie 101
4.5.1 Isolierung und Vorreinigung der Prostaglandine aus Makrophagenüberständen 102
4.5.1.1. Extraktionsmethoden 102
4.5.1.2. Flüssigkeitschromatographie 104

4.5.2. Gaschromatographie 107
4.5.2.1. Aufarbeitung der Proben 107
4.5.2.2. Die Prostaglandinderivate 109
4.5.2.3. Injektionsverfahren 111
4.5.2.4. Charakeristika der verwendeten Säulentypen und flüssigen Phasen 117
4.5.2.5. Vergleich von Radioimmunassay und Gaschromatographie anhand der Bestimmung unbekannter Mengen von $PGF_{2\alpha}$ 119
4.5.2.6. Identifizierung der durch LPS in Makrophagen induzierten Prostaglandine 120
4.6. Wirkungen von Prostaglandinen auf die Prostaglandin Biosynthese von Makrophagen 122
4.6.1. Einfluss von Prostaglandinen auf die LPS - induzierte PG-Synthese von Makrophagen 123
4.6.2. Einfluss von Prostaglandinen auf die Zymosan - induzierte PG-Synthese von Makrophagen 126
4.7. Wirkung von PGE_1 (E_2) auf die Phagozytose von Zymosanpartikeln 130
5. **DISKUSSION** 132
6. **LITERATURVERZEICHNIS** 145

Abkürzungen:

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CSF	Kolonien stimulierender Faktor (engl. Colony Stimulating Factor)
cpm	Counts pro Minute
EP	Endogenes Pyrogen
FCS	Fötales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
FID	Flammenionisationsdetektor
GPBS	0.9%-ige Kochsalzlösung (Phosphat gepuffert) mit 0,1% Gelatine
PBS	0.9%-ige Kochsalzlösung (Phosphat gepuffert pH 7.2) (engl. Phosphate Buffered Saline)
6-kPGF$_1$	6-keto Prostaglandin F$_1$
KDO	2-keto-3-Desoxyoctonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
LPS mRe ED TEA	Triäthylamin-Salzform des elektrodialysierten Lipopolysaccharids aus der Re-Mutante von Salmonella minnesota
LDH	Lactatdehydrogenase
MPI	Max-Planck-Institut
NAcGlcNase	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase
PG(s)	Prostaglandin(e)
TxA$_2$(B$_2$)	Thromboxan A$_2$ (B$_2$)

1. Zielsetzung der Arbeit und Zusammenfassung

Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) gram-negativer Bakterien stellen eine Naturstoffklasse dar, die nach Injektion in höhere Organismen eine Reihe sehr verschiedenartiger biologischer Wirkungen hervorruft. Endotoxine aus allen bisher untersuchten bakteriellen Gruppen sind nach demselben architektonischen Prinzip aufgebaut: sie bestehen aus einem Polysaccharid-Teil und einer daran kovalent gebundenen Lipid-Komponente (Lipoid A). Ihrer chemischen Natur nach sind Endotoxine daher Lipopolysaccharide (1, 106). Untersuchungen an Lipopolysacchariden verschiedener Herkunft (z.B. aus Salmonella, Escherichia, Pseudomonas) zeigten, dass die Struktur des Polysaccharid- Teils für eine Bakterienart charakteristisch ist, also beim Vergleich verschiedener Bakterien-Spezies (Serotypen) eine grosse Variabilität aufweist. Im Gegensatz dazu ist die Lipoid A-Komponente der Mehrzahl der bisher untersuchten Bakterien-Arten und -Familien gleich oder sehr ähnlich aufgebaut (vgl. 2.1.).

Im Vergleich zum heutigen Wissen über die Struktur, Biosynthese und Serologie bakterieller Lipopolysaccharide ist nur wenig bekannt über diejenigen Mechanismen, die den zahlreichen biologischen Wirkungen der Endotoxine zu Grunde liegen. In neuerer Zeit konnte bewiesen werden, dass für die Auslösung dieser Wirkungen die ubiquitäre Lipoid A-Komponente verantwortlich ist (148).

Unverständlich blieb allerdings, wie Lipoid A so verschiedenartige Effekte wie etwa Fieber, Tumornekrose und irreversiblen Schock auslösen kann.

Eine Hypothese zur Erklärung der Vielfalt der Endotoxinwirkungen formulierte V. Menkin in den vierziger Jahren. Nach diesem Konzept treten Endotoxine *in vivo* mit Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) in

Wechselwirkung, wobei es zur Freisetzung einer Reihe endogener (sekundärer) Mediatoren kommen soll. Von diesen endogenen Mediatoren wurde angenommen, dass sie mit spezifischen biologischen Eigenschaften ausgestattet und für die Auslösung der verschiedenartigen LPS-Wirkungen verantwortlich sind. Zur Zeit Menkins waren allerdings zytologische und analytische Methoden noch nicht ausreichend entwickelt um diese These experimentell zu überprüfen (vgl. 2.1.).

Es waren nun zwei neuere Befunde, die zu einer Wiederbelebung des Menkin'schen Konzeptes und zu der Fragestellung der vorliegenden Arbeit führten.

Seit langem ist bekannt, dass sich einige der biologischen Effekte der Endotoxine (wie z.B. Fieber und Blutdruckabfall) durch nicht steroidale Antiphlogistika wie Acetylsalicylsäure (Aspirin) und Indomethacin (Amuno) unterdrücken lassen und im Jahre 1971 fand Vane (12), dass diese Pharmaka potente Hemmstoffe der Biosynthese von Prostaglandinen sind. Prostaglandine repräsentieren eine Klasse biologisch hochwirksamer ungesättigter Hydroxy-Fettsäuren mit 20 C-Atomen (vgl. 2.2.). Injektion bestimmter Prostaglandine in Versuchstiere induziert ähnliche Wirkungen wie Endotoxine (Fieber, Blutdruckabfall). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Prostaglandine bei der Vermittlung von Endotoxin-Effekten eine Rolle spielen, oder dass sie möglicherweise endogene Mediatoren im Sinne von Menkin darstellen.

Durch die Arbeiten von Sultzer (99,100) wurde ein Mäusestamm bekannt (C3H/HeJ), der eine genetisch determinierte Resistenz gegen zahlreiche LPS-Effekte aufweist. Der Gruppe um Mergenhagen gelang es 1975 durch adoptiven Transfer von Milzzellen aus LPS-empfindlichen Mäusen, diese Resistenz zu durchbrechen. Als der für die Aufhebung der natürlichen

Resistenz verantwortliche Zelltyp wurden Makrophagen identifiziert. Diese Befunde machten wahrscheinlich, dass Makrophagen entscheidend bei der Vermittlung von LPS-Effekten beteiligt sind.

Die Vermutung, dass sowohl Prostaglandine als auch Makrophagen bei Endotoxin-Effekten eine Rolle spielen, führte zur ersten Fragestellung der vorgelegten Arbeit:

Induziert bakterielles LPS in Makrophagen die Synthese und Freisetzung von Prostaglandinen ? Als Modell für diese Untersuchungen dienten Maus-Knochenmarkmakrophagen (C57bl/6), und Peritoneaimakrophagen (NMRI). Der Nachweis und die Bestimmung von Prostaglandin E_2 und $F_{2\alpha}$ (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$) wurde mit Hilfe des Radioimmunassays durchgeführt (2.3.1.).

Es wurde gefunden:

1. Makrophagen verschiedener Herkunft synthetisieren erhöhte Mengen an PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$, wenn sie mit Lipopolysaccharid in vitro inkubiert werden (4.1.1., 4.1.2.).
2. Die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese ist abhängig von der Inkubationsdauer, LPS-Dosis und der Zellzahl (4.1.1.2., 4.1.2.3.).
3. Die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese kann mit Indomethacin gehemmt werden; in Makrophagenüberständen konnten keine Prostaglandinmetabolite gefunden werden. LPS induziert folglich eine de novo Synthese von Prostaglandinen(4.1.1.4.).
4. Zugabe von Arachidonsäure (Vorstufe der Prostaglandinbiosynthese) steigert die LPS-induzierte Produktion von Prostaglandine in Makrophagen; Zugabe von Arachidonsäure ohne LPS bedingt eine gleich hohe Bildung von Prostaglandinen. Der entscheidende Schritt bei der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese liegt somit in der Freisetzung der Arachidonsäure aus Phospholipiden, einer Reaktion, die durch

Phospholiphase A_2 katalysiert wird. Damit kommt dem Enzym Phospholipase A_2 bei der LPS-induzierten Prostaglandin-Biosynthese eine besondere Bedeutung zu (4.1.2.8.).

5. Die Identität der durch LPS induzierten Prostaglandine wurde durch hochauflösende Kapillargaschromatographie nachgewiesen. Makrophagen synthetisieren PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$, nicht jedoch PGE_1 und $PGF_{1\alpha}$. Prostacyclin (6-keto$PGF_{1\alpha}$) konnte nicht nachgewiesen werden (4.5.2.6.).

6. Inkubation von Makrophagen mit LPS sowohl aus Wild-Typ Bakterien R-Mutanten als auch mit freiem Lipoid A führten zu vergleichbarer Bildung von Prostaglandinen. Dies zeigt, dass Lipoid A das aktive Prinzip der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese darstellt (4.1.1.1., 4.1.2.7.).

7. Andere Zellen des reticuloendothelialen Systems wie Granulozyten und Milzzellen zeigten bei Inkubation mit LPS keine erhöhte Bildung von Prostaglandinen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Endotoxine (Lipoid A) in vitro bei Maus-Makrophagen eine de novo Synthese von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ induzieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, Hinweise auf eine Beteiligung von Makrophagen und daraus freigesetzter Prostaglandine bei *in vivo* Reaktionen von LPS zu erhalten. Experimente hierzu wurden an zwei Modellen durchgeführt.

Der Mausstamm C3H/HeJ weist, wie bereits erwähnt eine genetisch determinierte Resistenz gegenüber typischen Endotoxinwirkungen auf. Sollten Makrophagen und Prostaglandine bei diesen Wirkungen eine Rolle spielen, so

wäre zu erwarten, dass Makrophagen aus den resistenten Mäusen durch LPS nicht zur Prostaglandinsynthese angeregt werden können. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Peritonealmakrophagen aus C3H/HeJ Mäusen tatsächlich bei Inkubation mit LPS nicht zur Prostaglandinsynthese angeregt werden. Makrophagen eines genetisch verwandten, LPS-sensitiven Stammes (C3H/Sw/Sn) können wie erwartet mit LPS zur Prostaglandin-Bildung stimuliert werden. Am Modell der LPS-unempfindlichen C3H/HeJ Maus zeichnet sich eine Beziehung ab zwischen LPS-Resistenz des Wirtes und der Unfähigkeit seiner Makrophagen, nach LPS-Reiz Prostaglandine zu bilden (4.1.2.6.).

In weiteren Versuchsserien wurden Mäuse untersucht, in denen durch LPS-Vorbehandlung Hyperreaktivität bzw. Toleranz gegen LPS-Letalität erzeugt worden war. Es war bekannt (76), dass Mäuse nach Gabe geringer Dosen von LPS 24 Stunden später (Tag 1) überempfindlich gegenüber der letalen Wirkung von Endotoxin sind (LD_{50} 4-fach geringer als in unbehandelten Tieren). Andererseits war gezeigt worden, dass Tiere 96 Stunden nach einer LPS-Vorbehandlung (am Tag 4) weitgehend resistent gegen LPS-Letalität sind (LD_{50} 5-fach höher als bei unbehandelten Tieren). Um zu prüfen, ob sich Wirtsempfindlichkeit mit Prostaglandinsynthese von Makrophagen korrelieren lässt, wurden Peritonealmakrophagen überempfindlicher (Tag 1) und toleranter (Tag 4) Tiere darauf hin untersucht, wie sie bei LPS-Stimulation in der Lage sind Prostaglandine zu bilden und inwieweit sie sich in anderen Zellfunktionen unterscheiden (4.4.).

Es wurde gefunden:

1. Gegenüber Makrophagen aus unbehandelten Tieren ruft LPS-Stimulation in Makrophagen aus überempfindlichen Mäusen eine erhöhte Synthese

von Prostaglandinen hervor; Makrophagen aus toleranten Mäusen zeigen dagegen eine stark verminderte Bildung von Prostaglandinen (4.4.1.).

2. Der refraktäre Zustand der Makrophagen aus toleranten Tieren konnte nicht durch Zugabe höherer Mengen LPS oder durch Vorinkubation in vitro durchbrochen werden (4.4.1.).

3. Bei Inkubation der Zellen mit Zymosan bilden hyperreaktive Makrophagen weniger, tolerante dagegen gleichgrosse Mengen Prostaglandin wie normale Makrophagen (4.4.2.). Das bedeutet, dass die beobachtete LPS-Resistenz toleranter Makrophagen LPS spezifisch ist.

4. Die Phagozytosekapazität von toleranten Makrophagen war erheblich gesteigert, während jene von hyperreaktiven Zellen unterdrückt war. Dies zeigt, dass die Fähigkeit Partikel aufzunehmen nicht mit der LPS-induzierten Prostaglandinbildung korreliert (4.4.5.).

Die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die vermehrte Prostaglandinsynthese mit dem Phänomen der LPS-Überempfindlichkeit eng verknüpft ist. Gleichzeitig liegt möglicherweise dem Mechanismus der Endotoxin-Toleranz eine Beeinträchtigung der Prostaglandin-Bildung von Makrophagen zu Grunde. Dies würde auch bedeuten, dass sich Toleranz auf zellulärer Ebene manifestiert und nicht, wie seither vermutet, weitgehend durch humorale Faktoren vermittelt wird.
Diese Ergebnisse stehen darüberhinaus mit der Hypothese in Einklang, dass Makrophagen und von ihnen produzierte Prostaglandine bei der Entfaltung von LPS-Wirkungen eine wichtige Rolle spielen. Sie lassen allerdings ungeklärt, wie LPS-induzierte Prostaglandine in vivo wirken.
Im Modell des Endotoxin-induzierten Fiebers konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass freigesetzte Prostaglandine der E-Serie auf thermoregulatorische Zentren (wie Hypothalamus) einwirken (49).

In diesem System sind Prostaglandine demnach als sekundäre Mediatoren zu betrachten. Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass Prostaglandin die Bildung endogener Mediatoren von LPS-Wirkungen aus Makrophagen hemmen (66) oder fördern können (65). Dies bedeutet, dass aus Makrophagen stammende Prostaglandine die Synthese und Freisetzung anderer Mediatoren aus Makrophagen im Sinne einer negativen oder positiven Rückkopplung hemmen.

In diesem Zusammenhang war es interessant zu prüfen, ob exogene Prostaglandine auch die Biosynthese von Prostaglandinen in Makrophagen beeinflussen.

Im dritten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss von exogenem PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$ auf die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen untersucht. Zum Vergleich wurde auch die Wirkung von PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$ auf die Zymosan-induzierte Prostaglandinsynthese analysiert. Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Prostaglandinbestimmungen wurden ausschliesslich mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie durchgeführt.

1. Zunächst wurde gefunden, dass die LPS-induzierte Synthese von PGE_2 in Makrophagen mit PGE_1 oder $PGF_{2\alpha}$ nicht beeinflusst wurde. In beiden Fällen war die Menge an gebildetem PGE_2 (60 ng) vergleichbar der, die von Kontrollzellen produziert wurde (57 ng).
2. Einen dramatischen Effekt dagegen übte PGE_1 auf die Zymosan-induzierte Prostaglandinsynthese aus. Es wurde gefunden, dass die Inkubation der Makrophagen mit PGE_1 die <u>de novo</u> Synthese von PGE_2 hemmte (~50%) die Synthese von PGI_2 dagegen um etwa 400 % steigerte. Die Menge an gebildetem $PGF_{2\alpha}$ war vergleichbar in PGE_1-behandelten und Kontrollmakrophagen. Eine geringere Steigerung der Synthese von PGI_2 wurde durch Zugabe von $PGF_{2\alpha}$ erreicht, ($PGF_{2\alpha}$

zeigte aber keinen Einfluss auf die Synthese von PGE_2).

3. Die Hemmung der PGE_2-Bildung durch PGE_1 konnte mit Arachidonsäure (aber auch mit Palmitinsäure) aufgehoben werden, wodurch die Bildung von PGI_2 zurückging.

Obwohl diesen Versuchen vorläufiger Charakter zugeschrieben werden muss, zeigen sie doch, dass 1. Peritonealmakrophagen der Maus die zur Synthese von Prostacyclin notwendigen Enzymsysteme besitzen und 2. Prostaglandine (insbesondere die der E-Serie) steuernd in die Biosynthese der Prostaglandine eingreifen können. Möglicherweise muss PGE_1 zur Entfaltung seiner Wirkung in die Zelle aufgenommen werden. Es ist denkbar, dass diese Aufnahme während der Phagozytose von Zymosan erleichtert ist, durch LPS jedoch nicht vermittelt wird, woraus sich die Unwirksamkeit von PGE_1 auf die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese erklären liesse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und neuere Untersuchungen anderer Laboratorien machen es wahrscheinlich, dass Prostaglandine bei einigen Endotoxinwirkungen eine entscheidende Rolle spielen. Diese Erkenntnis ist von besonderer Bedeutung wenn an die pharmakologische Kontrolle von unerwünschten LPS-Effekten gedacht wird. Heute stehen eine Reihe wirksamer Hemmstoffe der Prostaglandin-Biosynthese, sowie spezifische Prostaglandin Antagonisten zur Verfügung, von denen bereits bekannt ist, dass sie einige für den Organismus schädliche Endotoxinwirkungen (Blutdruckabfall, Abort, Schwartzman-Phänomen) verhindern können. Andere LPS-Wirkungen wie z.B. Regression und Nekrose experimenteller Tumoren (Sarkome) werden durch Indomethacin nicht gehemmt (150). Dies bedeutet, dass durch Applikation nicht steroidaler Antiphlogistika unerwünschte Endotoxin-Effekte unterdrückt werden, während erwünschte Wirkungen unbeeinflusst zur Ent-

faltung kommen können. Es erscheint deshalb vorstellbar, dass Endotoxin (in Verbindung mit Prostaglandin-Antagonisten bzw. Hemmstoffen der Prostaglandin-Biosynthese) zukünftig auch therapeutisch eingesetzt werden können.

2. EINLEITUNG

2.1. Struktur und Wirkung bakterieller Endotoxine (Lipopolysaccharide)

Endotoxin ist das toxische, hitzestabile, Prinzip, welches von gramnegativen Bakterien produziert wird (1). Es ist als hochmolekularer Komplex in deren Zellwand gebunden und besteht aus Polysaccharid, Lipid und gelegentlich geringeren Mengen Protein. Wird die Bakterienzelle lysiert, so gelangt dieser endotoxische Komplex in das umgebende Medium. Endotoxine sind ein charakteristisches Merkmal aller gramnegativen Bakterien, wie z.B. der pathogenen und nicht pathogenen Enterobacteriaceae wie Salmonella, Schigella, Escherichia, Proteus, Yersinia u.a. Dem endotoxischen Komplex sind eine Reihe biologischer Aktivitäten eigen, wovon einige von therapeutischem Nutzen sein könnten, andere hingegen für den Wirtsorganismus schädlich sind. Zu den erwünschten Aktivitäten gehört z.B. die pyrogene (fieber-erregende) Eigenschaft des Endotoxins, die schon früh zur Fiebertherapie, etwa zur Heilung syphilitisch Erkrankter durch künstlich induzierte Malaria eingesetzt wurde. Die Induktion eines solchen Fiebers durch Injektion abgetöteter, endotoxin-tragender Bakterien ist oft zur Heilung chronischer Entzündungen verwendet worden (1).

Höhere Dosen Endotoxin haben beim krebskranken Tier die Regression des Tumors und seine Nekrose zur Folge.

Behandlungen, die grosse Mengen Endotoxin erforderlich machen, führen andererseits oft zum septischen Schock und schliesslich zum Tod, sodass in diesen Fällen ein klinischer Einsatz unmöglich ist (3,4).

Besondere Beachtung fanden Endotoxine in den letzten zwei Jahrzehnten durch ihre aktivierenden Wirkungen auf die Abwehrmechanismen höherer Organismen. Neben der seit längerem bekannten Adjuvanswirkung (5), wurde neuerdings die mitogene Wirkung von Endotoxin auf B-Lymphozyten entdeckt

(6). Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war die Interaktion von Endotoxin mit dem Komplementsystem (7,8). Einen besonders drastischen Effekt übt Endotoxin auf die Mobilisierung von Leukozyten aus, wobei schon geringste Dosen (30 ng im Mensch) ausreichen, um die Zahl zirkulierender Leukozyten zu versechsfachen (1). Diese Tatsache fand ihre Anwendung im Knochenmarkfunktionstest nach Heilmeyer (9).

Welche strukturellen Merkmale weist das Endotoxinmolekül auf, das ein solches Spektrum biologischer Phänomene auslöst ? Endotoxine sind, wie Lüderitz und Westphal fanden, chemisch Lipopolysaccharide (LPS, Abb. 1).

Als solche bestehen sie aus zwei kovalent miteinander verknüpften Komponenten, einem Heteropolysaccharid-Teil und einem Lipid-Teil, der als Lipoid A bezeichnet wird.

Schematische Struktur eines Salmonella Lipopolysaccharids

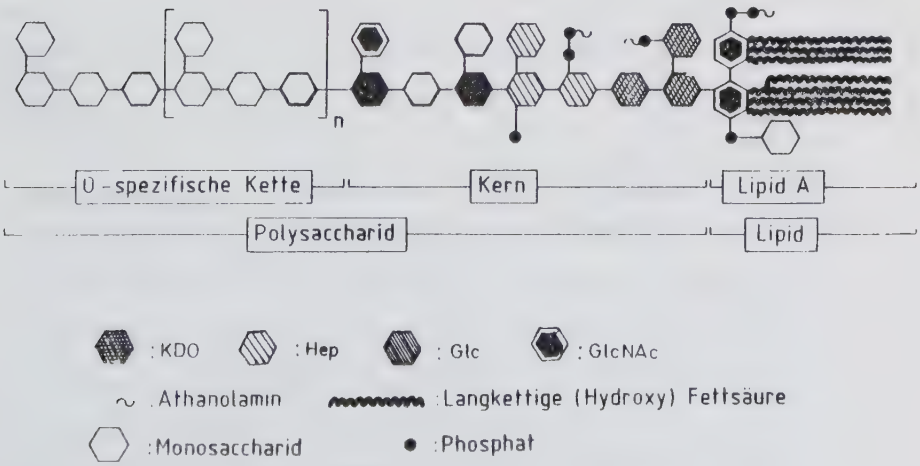
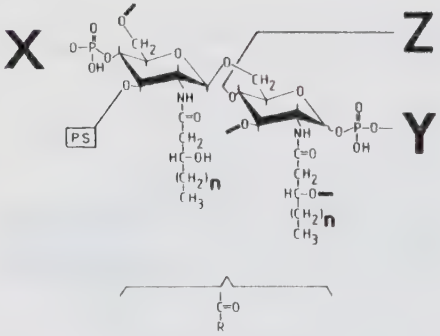


Abb. 1: Schematische Struktur eines Salmonella Lipopolysaccharids

Der Polysaccharidteil setzt sich aus der O-spezifischen Kette und einem Kernoligosaccharid zusammen. Die O-spezifische Kette ist aus etwa 20 sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, den "repeating units" aufgebaut. Diese determinieren die O-Spezifität der Lipopolysaccharide und der sie enthaltenden Bakterien. Das Kernoligosaccharid besteht aus einer Zuckerkette, deren Monosaccharidbausteine Substituenten wie Phosphat, Phosphoäthanolamin, Pyrophosphoäthanolamin und andere Monomere tragen. An das Kernoligosaccharid ist kovalent eine Lipidkomponente, das sogenannte Lipoid A (149) geknüpft (Abb. 2).



X	Y	Z	n	
H	H	COR	10	Escherichia coli
4-AraN	H	COR	10	Proteus mirabilis
4-AraN	PEtN	COR	10	Salmonella spp
4-AraN	GlcN	COR	8	Chromobacterium violaceum
4-AraN	Ara(f)	GlcN	6	Rhodospirillum tenue

9

Abb. 2: Chemische Struktur von Lipoid A

Lipoid A besteht aus einem ß1,6-verknüpften Glucosamin Disaccharid welches zwei Phosphatreste (an C4' und C1 trägt, die mit L-4-Aminoarabinose (C4) und Phosphoryläthanolamin, 6-Glucosamin oder Arabinose (C1) substituiert sind. Seinen lipoiden Charakter verdankt es der Anwesenheit langkettiger Fettsäuren, welche an die Hydroxyl- und Aminofunktionen des zentralen Disaccharids gebunden sind. In Amidbindungen liegen ausschließlich D-3-OH Fettsäuren vor. Lipopolysaccharid repräsentiert ein amphipatisches Molekül, dessen hydrophiler Polysaccharidanteil die serologischen Eigenschaften des LPS und seine Löslichkeit in wässriger Umgebung vermittelt, während der hydrophobe Anteil (Lipoid A) verantwortlich ist für alle endotoxischen Eigenschaften. Lipoid A zeigt auch Eigenschaften eines amphipatischen Moleküls, die einerseits durch das hydrophobe, acylierte Glucosamin Disaccharid und andererseits durch die hydrophilen Phosphatreste zustande kommen. Lipoid A besitzt außerdem durch die Anwesenheit saurer (Phosphat) und basischer (Amino) Gruppen die Merkmale eines amphoteren Moleküls.

Im Gegensatz zu bakteriellen Exotoxinen, deren Wirkung immer auf bestimmte Zelltypen oder Gewebe beschränkt ist, rufen Lipopolysaccharide als bakterielle Endotoxine in einer Vielzahl von Säugetiergeweben die unterschiedlichsten Wirkungen hervor. Dieses breite Spektrum der verschiedensten pharmakologischen, physiologischen und pathophysiologischen Effekte machten es schwer, den Wirkungsmechanismus der Endotoxine zu verstehen. Neuere Untersuchungen (zusammengefasst in 10) machen wahrscheinlich, dass sich das von Valy Menkin (11) bereits 1943 postulierte Konzept bewahrheitet, nachdem Endotoxine nicht direkt Stoffwechselfunktionen von Zellen oder Geweben beeinflussen, sondern vielmehr Zellen des retikuloendothelialen Systems zur Freisetzung endogener Mediatoren anregen. Diese Mediatoren sind dann verantwortlich für die Auslösung der verschiedenen systemischen

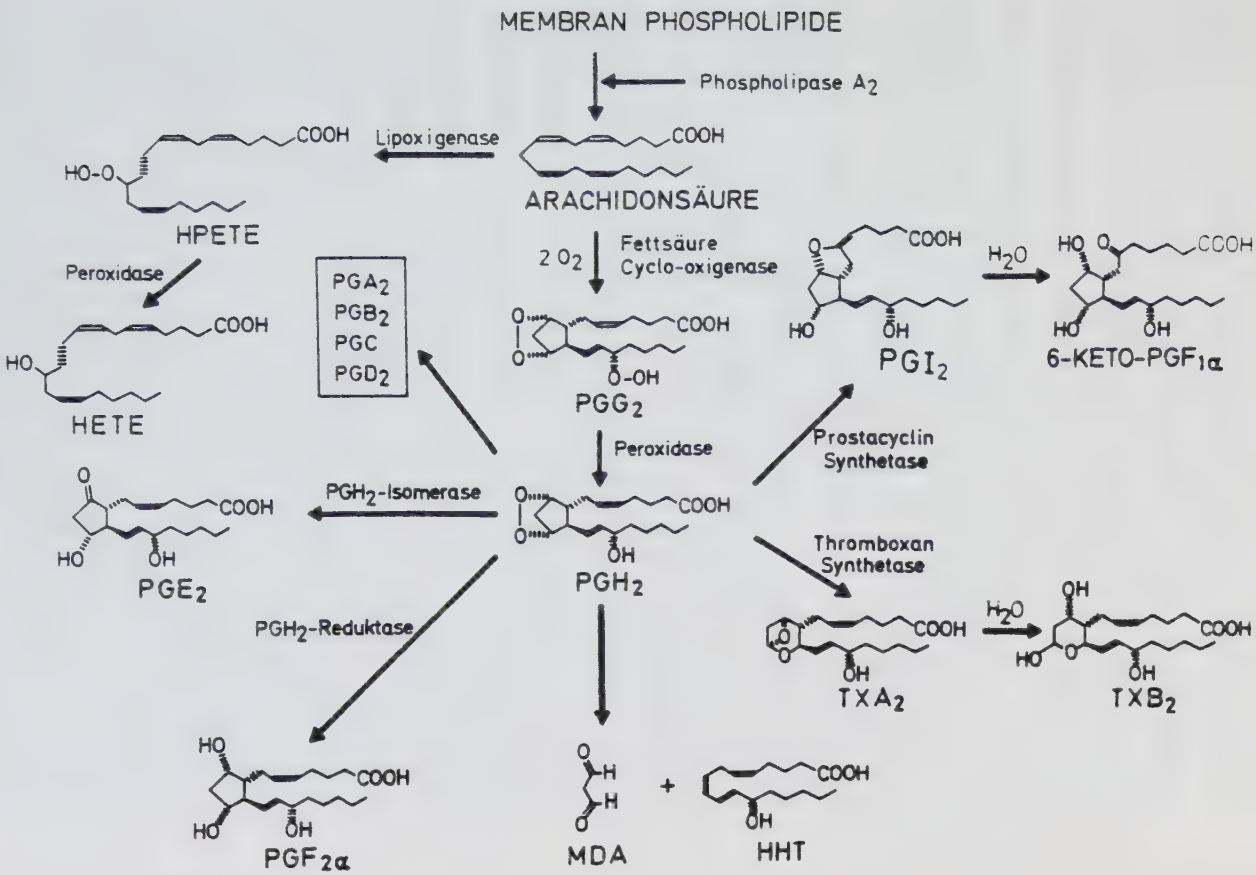
Endotoxineffekte. In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl solcher sekundärer Mediatoren der LPS-Wirkung entdeckt. Hierzu gehören z.B. der Tumornekrotisierende Faktor (TNF), Kolonienstimulierender Faktor (CSF) oder Endogenes Pyrogen (EP). Als Zellen, die nach Kontakt mit LPS Mediatoren freisetzen, wurden in allen untersuchten Fällen Phagozyten, insbesondere Makrophagen erkannt.

2.2. Prostaglandine: Struktur, Biosynthese, Metabolismus und biologische Wirkungen

Bestimmte LPS-Wirkungen wie z.B. Fieber können durch nicht-steroidale Antiphlogistica wie Aspirin oder Indomethacin unterdrückt werden. Durch die Entdeckung von Vane et al. (12), daß es sich bei diesen Substanzen um spezifische Hemmstoffe der Prostaglandinbiosynthese handelt, wurde der Blick auf die Prostaglandine als mögliche Mediatoren bestimmter, durch LPS ausgelöster Phänomene, gelenkt.

Unter dem Begriff Prostaglandine fasst man eine Gruppe biologisch ausserordentlich aktiver, langkettiger, ungesättigter Hydroxyfettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen zusammen, welche einen Pentanring im Molekül tragen, der unterschiedlich mit Hydroxy- und Ketogruppen substituiert ist. Ihre Struktur und Biosynthese wurde im Wesentlichen von der Gruppe um Bergström, Hamberg und Samuelsson in Schweden, sowie Lands und Nugteren aufgeklärt.

Abb. 3: Die Struktur und Biosynthese von Prostaglandinen und Thromboxanen (verändert nach Nalbandian 13)
MDA: Malondialdehyd
HPTE: 12-L-Hydroperoxy-5,8,10,14,Eicosatetraenoat
HETE: 12-L-Hydroxy-5,8,10,14,Eicosatetraenoat
HHT: 12-L-Hydroxy-5,8,10,Heptadecatrienoat


MEMBRAN PHOSPHOLIPIDE
Phospholipase A_2
ARACHIDONSÄURE
Lipoxigenase
HPETE
Peroxidase
HETE
$2\ O_2$
Fettsäure Cyclo-oxigenase
PGG_2
Peroxidase
PGH_2
PGA_2
PGB_2
PGC
PGD_2
PGH_2-Isomerase
PGE_2
PGH_2-Reduktase
$PGF_{2\alpha}$
MDA
HHT
Prostacyclin Synthetase
PGI_2
H_2O
6-KETO-$PGF_{1\alpha}$
Thromboxan Synthetase
TXA_2
H_2O
TXB_2

Prostaglandine und Thromboxane entstehen biosynthetisch aus polyungesättigten Fettsäuren, welche in den Membranen von Säugetierzellen in den Phospholipiden gebunden vorliegen. Solche mit zwei Doppelbindungen (5,6 cis; 13,14 trans) in den Seitenketten, auf welchen das Hauptinteresse dieser Arbeit liegt entstehen aus Arachidonsäure. Substrat für die Prostaglandinsynthese ist die freie Arachidonsäure, sie muss aus dem Reservoir der Membranphospholipide zur Verfügung gestellt werden. Diesen ersten Schritt der Prostaglandinsynthese katalysiert das Enzym Phospholipase A_2, welches spezifisch die Esterbindung am Kohlenstoffatom 2 von Phospholipiden hydrolysiert (14,15,16). Die nächsten Schritte der Biosynthese werden von einem Enzymkomplex katalysiert, welcher als Prostaglandinsynthetase bezeichnet wird. Zuerst wird durch eine Untereinheit des Komplexes, der Cyclooxygenase, in das Molekül unter Cyclisierung des Pentanringes 2 Mol molekularen Sauerstoffs eingebaut. An diesem Schritt setzen die Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese, Aspirin und Indomathacin an, indem sie die Cyclooxygenase (s. Abb. 2) irreversibel wie im Falle des Aspirins bzw. reversibel (Indomethacin) hemmen. Das Produkt der Cyclooxygenase ist das Endoperoxid PGG_2. Dieses wird durch eine Peroxydase zum Endoperoxid PGH_2 reduziert. Durch weitere Enzyme (Isomerase, Reduktase) werden die relativ stabilen, sogenannten primären Prostaglandine wie z.B. PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ (s. Abb. 2) gebildet. Die Endoperoxide können durch Prostacyclinsynthetase in Prostacyclin (PGI_2) und durch Thromboxansynthetase in Thromboxan A_2 (TxA_2) umgewandelt werden. PGI_2 wird hauptsächlich in den Endothelzellen der Blutgefäße gebildet. Es ist in wässrigen Lösungen instabil, und bei physiologischen Bedingungen bildet sich unter Anlagerung von H_2O sein stabiles Derivat 6-keto-Prostaglandin F_1 (6-k-$PGF_{1\alpha}$) (Abb. 2). TxA_2 welches erstmals in Thrombozyten gefunden wurde ist eine extrem labile Substanz mit einer biologischen Halbwertszeit von 30 sec. bei 37°C. Unter Anlagerung von

H_2O am Acetal-Carbon lagert es sich um in das stabile Derivat TxB_2 (Abb. 3).

Alle bisher untersuchten Organe von Säugetieren sind zur Synthese von Prostaglandinen, Prostacyclin oder Thromboxanen befähigt. Die Endprodukte der Endoperoxide können in verschiedenen Geweben ganz unterschiedlicher Natur sein und antagonistische Wirkungen haben. So wird in den Endothelzellen der Blutgefässe PGI_2 synthetisiert, das vasoconstriktorisch wirkt und die Blutplättchenaggregation und damit auch Thrombenbildung verhindert. TxA_2 wird in Thrombozyten gebildet, hat vasodilatorische Wirkung und ist ein potenter Induktor der Blutplättchenaggregation. Ähnliche antagonistische Effekte sind die bronchodilatorische, bzw. -constriktorische Wirkung von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$. Gelangen Prostaglandine in die Zirkulation, werden sie rasch enzymatisch inaktiviert (17). PGE_2 wird während einer einzigen Passage durch Lunge oder Leber zu 90% in biologisch unwirksame Metaboliten umgewandelt. Im peripheren Blut wird bei PGE_2 durch die stereospezifische 15-S'Hydroxy-PG-Dehydrogenase die Hydroxyfunktion an C15 zum Keton oxidiert, die 13,14-PG-Reduktase katalysiert die Bildung von 13,14-Dihydro,15-keto-Prostaglandin. Vom Carboxylende her wird die Kette durch β-Oxidation unter Carboxylierung bis C5 abgebaut. Am ω-Ende wird zur Carboxylfunktion oxidiert. Das entstandene 2,3,4,5,tetranor-13,14-dihydro--15-keto,20-Carboxy-Produkt wird als biologisch inaktiver Hauptmetabolit im Urin ausgeschieden.

Prostaglandine werden nicht in Geweben gespeichert und unter dem Einfluß gewisser Stimuli sezerniert, sondern im Bedarfsfall neu synthetisiert. Im Gegensatz zu den klassischen Hormonen ist der Wirkungsort der Prostaglandine praktisch immer dasjenige Gewebe,welches sie auch synthetisiert. Gelangen Postaglandine in die Zirkulation, werden sie, wie oben für PGE_2

ausgeführt wurde, schnell zu biologisch unwirksamen Metaboliten umgewandelt. Diese Unterscheidung zu anderen Hormonen schlägt sich in der Bezeichnung "Gewebshormone" nieder, wie die Prostaglandine auch genannt werden. Der Mechanismus der Prostaglandinwirkung scheint in vielen Fällen darin zu bestehen, dass sie ebenso wie z.B. Adrenalin die Adenyl-, bzw. Guanylcyclase von Zielzellen aktivieren und somit die intrazelluläre Konzentration der "second messenger" cAMP oder cGMP erhöhen (18). In verschiedenen prostaglandinsensitiven Geweben wie z.B. dem Ovar oder Makrophagen wurden Rezeptoren mit hoher Spezifität für Prostaglandine der E-Serie nachgewiesen (19).

2.3. Analytische Methoden zur Bestimmung von Prostaglandinen

Die am häufigsten zur Bestimmung von Prostaglandinen eingesetzten Methoden sind Bioassay (20), Radioimmunoassay und Gaschromatographie, meist gekoppelt mit Massenspektroskopie. Im Folgenden seien die Verfahren des Radioimmunassays und der Gaschromatographie grob umrissen, da sie die analytischen Methoden im Rahmen dieser Arbeit darstellen.

2.3.1. Radioimmunoassay

Ausgangspunkt für die Entwicklung von radioimmunologischen Analysen war die Beschreibung einer immunologischen Methode zur Bestimmung von Insulin im Plasma. 1960 beobachtete R.S. Yalow (21), dass Insulin, das mit radioaktivem Jod markiert war von Gammaglobulinen gebunden wurde und dass diese Bindung durch Zugabe von nicht markiertem Insulin gehemmt werden konnte. Diese Erkenntnis kann zur quantitativen Bestimmung unbekannter Mengen einer bestimmten Substanz ausgenutzt werden.

Bis heute sind für eine große Anzahl der verschiedensten Stoffe (Hormone, Peptide u.a.), radioimmunologische Bestimmungsmethoden entwickelt worden. Ein Radioimmunassay für Prostaglandine wurde erstmalig von Levine und van Vunakis 1970 für PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$ beschrieben. Die schnelle Entwicklung dieser Methode ist auf ihre universelle Einsetzbarkeit, die Spezifität der Reaktion des Antikörpers und auf ihre hohe Empfindlichkeit zurückzuführen.

Das Prinzip des Radioimmunassys (RIA) beruht darauf, daß markierte und unmarkierte Moleküle derselben Substanz um die Bindungsstelle an einem Antikörper konkurrieren, der gegen eben diese Substanz gerichtet ist.
Man setzt in einem Experiment eine bekannte, konstante Menge der markierten, zu bestimmenden Substanz, das Antigen ein. Mit einem Teil der Proben wird durch Hinzufügen bekannter Mengen des nicht markierten Antigens in steigender Konzentration eine Standardkurve erstellt. Der andere Teil der Proben wird dazu verwendet, unbekannte Mengen des Antigens aus zu analysierenden Proben aufzunehmen. Da der Antikörper nicht zwischen markiertem und unmarkiertem Antigen unterscheiden kann, hängt die Menge des letztlich vom Antikörper gebundenen radioaktiv markierten Antigens im Idealfall nur von der Menge des unmarkierten Konkurrenten ab.
In Gegenwart weniger unmarkierter Moleküle wird folglich eine große Anzahl der markierten Antigene vom Antikörper gebunden. Sind größere Mengen unmarkierter Substanzen vorhanden, wird der Betrag an gebundener markierter Substanz kleiner sein. Nachdem sich dieses Gleichgewicht eingestellt hat, werden durch eine geeignete Methode, z.B. durch Adsorption an Aktivkohle (22, 23, 24) die freie Fraktion von der an den Antikörper gebundenen getrennt. Die Radioaktivität, die am Antikörper gebunden bleibt wird gemessen. Durch Vergleich mit den in der Standardkurve erhaltenen Werten kann die Menge der Substanz in der Probe errechnet werden.

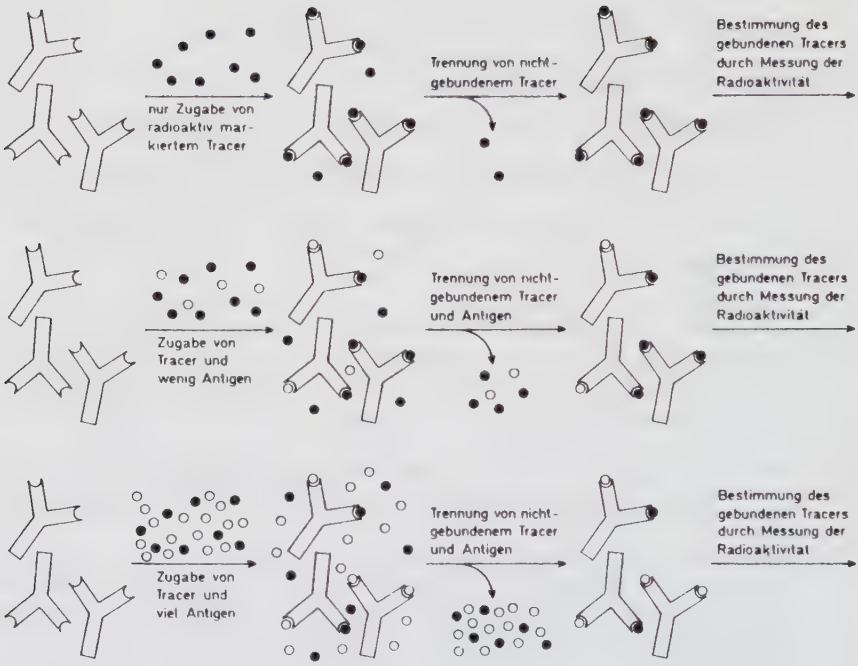


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Radioimmunoassays (25, S. 17).

Vorausetzung für einen solchen Radioimmunassay ist freilich die Verfügbarkeit eines radioaktiven Antigens und eines dagegen gerichteten spezifischen Immunserums.

Neben den mit ^{125}J markierten Substanzen werden besonders häufig Tritiummarkierungen eingesetzt, da sich in der Mehrzahl der biologisch interessanten Moleküle Wasserstoffatome befinden, welche durch Tritium ersetzt werden können. Die Einführung von Tritium gelingt entweder chemisch (durch katalytischen Austausch) oder enzymatisch durch Einsatz markierter Vorstufen.

Bisher sind nur einige Mitglieder der Prostaglandinfamilie als markierte Substanzen auf dem Markt. Methoden zur Darstellung markierter Prostaglandine wurden beschrieben (26, S.39), sind jedoch nicht ohne weiteres in jedem Labor durchzuführen.

Prostaglandine sind wie die Mehrzahl der Moleküle mit molaren Massen unter 1000 nicht immunogen. Wie andere Haptene lassen sich Prostaglandine aber in eine immunogene Form überführen etwa durch Kupplung an ein Trägerprotein.

Bei Prostaglandinen kann diese Kupplung über die Carboxylgruppe an freie Aminogruppen eines Proteins erfolgen. Die für die Spezifität des Antikörpers determinanten funktionellen Gruppen im Molekül (Hydroxyl- und Ketogruppen im Pentanring, Doppelbindung) werden dabei nicht verändert. Bevorzugt wird die Carbodiimid-Methode (unter Verwendung wasserlöslicher Carbodiimide) eingesetzt (27,28).

Das so gebildete Immunogen wird zur Gewinnung von spezifischen Antiseren in gelöster Form in Meerschweinchen, Kaninchen, Schafe oder Ziegen injiziert. Zur Steigerung der Immunantwort wird das Immunogen in Freund'schem Adjuvans emulgiert (abgetötete Tuberkelbazillen, Mineralöl, Wachs). Um hochtitrige und spezifische Antiseren zu gewinnen, müssen mehrere Injektionen in verschiedenen Zeiträumen vorgenommen werden.

Zum eigentlichen Radioimmunassay wird eine konstante Menge radioaktiven Prostaglandins ($^3HPGE_2$, $^3HPGF_{2\alpha}$) mit der Menge Antikörper inkubiert, welche 40-60% der Radioaktivität bindet. Werden steigende Mengen nicht markierten Prostaglandins zugegeben, erhält man nach Adsorption der freien Fraktion an Aktivkohle und Zentrifugation durch Messung der Radioaktivität im Überstand folgende Standardkurve (Abb. 5).

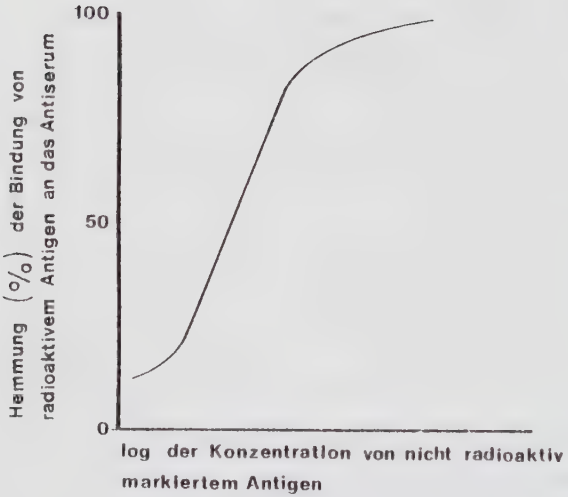


Abb. 5: Standardkurve für einen Radioimmunassay

Diese Eichkurve ist im Bereich zwischen 90% und 10% Hemmung nahezu eine Gerade. Sie wird somit für eine Regressionsanalyse zugänglich. Man bestimmt für die zu analysierenden Proben die prozentuale Hemmung gegenüber Werten ohne Antiserum (100% "Hemmung") und solchen mit Antikörper und ohne unmarkiertem Antigen (0% Hemmung). Anhand der aufgestellten Eichkurve erhält man durch eine Regressionsrechnung für jede gemessene Radioaktivität im Überstand einen Wert für den Gehalt an Prostaglandin. Die Genauigkeit der Schätzung hängt von der Linearität der Standardkurve und damit vom präzisen Einpipettieren der Standardmengen ab.

Unter der Voraussetzung, dass der Antikörper nicht unspezifisch mit anderen Substanzen als Prostaglandinen reagiert, ergeben sich für das beschriebene

radioimmunologische Verfahren folgende Vorteile:

- Das Verfahren ist sehr empfindlich, sodass sehr geringe Prostaglandin-Konzentrationen bestimmt werden können.
- Der Test kann ohne aufwendige Extraktion und Reinigung der Prostaglandine direkt im Serum, Homogenatüberständen usw. durchgeführt werden.
- Es sind heute bereits für einige Prostaglandine komplette Radioimmunassays im Handel erhältlich, deren Nachteil allerdings in der Höhe ihres Preises besteht.

Radioimmunassays unterliegen einigen prinzipiellen Beschränkungen. Es können unspezifische Reaktionen der Antikörper mit Substanzen im Test auftreten, die die Gegenwart von Prostaglandinen vorspiegeln. Es treten Kreuzreaktionen mit anderen Prostaglandinen auf, wie z.B. zwischen den eng verwandten Prostaglandinen E_1 und E_2, die sich nur in einer Doppelbindung unterscheiden.

Mit dem jeweiligen, gegen ein bestimmtes Prostaglandin gerichteten Antiserum kann immer nur ein Prostaglandin bestimmt werden. Will man mehrere Prostaglandine bestimmen, müssen gegen jedes einzelne Antikörper hergestellt werden, was mit grossem zeitlichem Aufwand verbunden ist.

Aus diesen Gründen erschien es von Vorteil ein zweites, unabhängiges Analysenverfahren zu haben, welches den oben genannten Beschränkungen nicht unterliegt.

2.3.2. Gaschromatographie

Das Verfahren der Gaschromatographie stellt seit den Anfängen der Strukturaufklärung von Prostaglandinen zu Beginn der sechziger Jahre (29-32) eines der wichtigsten analytischen Mittel dar. Besondere Bedeutung erlangte die Kopplung von Gaschromatographie-Massenspektroskopie aufgrund der zuverlässigen Informationen, die eine massenspektrometrische Analyse über die Struktur eines Moleküls liefert. Die gaschromatographische Analytik leistete einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis qualitativer und quantitativer Aspekte sowohl der Prostaglandinbiosynthese aus Arachidonsäure über die Zwischenstufe der Endoperoxide, wie auch deren enzymatische Inaktivierung und des Prostaglandinmetabolismus (33-44).

Die Strukturaufklärung von Thromboxan A_2, Prostacyclin (PGI_2) und deren stabiler Metaboliten Thromboxan B_2 (TxB_2) und 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ wäre ohne die Methode der gekoppelten Gaschromatographie-Massenspektroskopie nicht so rasch möglich gewesen.

In der Bewertung ihrer physiologischen Funktionen muss der exakten Quantifizierung der Prostaglandine, die von verschiedenen Geweben, Zellen und Flüssigkeiten unter bestimmten Bedingungen synthetisiert werden, ein besonderer Stellenwert beigemessen werden. Die bislang exakteste und gleichermassen empfindliche Methode wurde 1970 von Samuelsson et al. beschrieben (45).

Zu einer biologischen Probe, in der z.B. der Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ bestimmt werden soll, wird als sogenannter "Carrier" (^2H)$PGF_{2\alpha}$ (500-1000 ng) zugegeben. Nach Extraktion, Reinigung und Derivatisierung der Proben kann das Verhältnis zwischen deuteriertem und nicht markiertem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ aus den massenspektroskopischen Daten entnommen werden. Da die Menge der hinzugefügten, markierten Komponente bekannt ist, kann man die Menge an

nicht markierter Substanz leicht errechnen. Beide Komponenten unterscheiden sich ausser in ihren massenspektroskopischen Fragmenten praktisch nicht in ihren physikochemischen Eigenschaften, sodass das zugesetzte markierte Prostaglandin während der Extraktion und Reinigung als Träger ("Carrier") und als interner Standard für die massenspektrometrische Analyse dient. Voraussetzung für diese Methode ist neben dem großen instrumentellen Aufwand die Verfügbarkeit deuterierter Substanzen, von denen wie auch im Fall tritiummarkierter Prostaglandine nur wenige im Handel erhältlich sind.

Im GC-MS-System bewirkt die Gaschromatographie eine Vortrennung und Reinigung der Proben und stellt das Einlassystem für das Massenspektrometer dar. In neuerer Zeit wurden Versuche unternommen, rein gaschromatographische Methoden auszuarbeiten, um unabhängig von der massenspektrometrischen Analyse eine Empfindlichkeit zu erreichen, die die Bestimmung von Prostaglandinen in biologischen Proben erlaubt.

Jouvenaz et al. setzten 1970 (46) für die Analyse von Prostaglandinen der E-Serie einen Elektronen Einfangdetektor (ECD) ein. Mit diesen Detektoren können spezifisch und mit hoher Empfindlichkeit elektronenreiche Verbindungen nachgewiesen werden, z.B. solche, die viele π -Elektronen (konjugierte Doppelbindungen) aufweisen, oder Halogenatome im Molekül tragen.

PGE kann leicht durch Behandlung mit Lauge in PGB umgewandelt werden, welches, bedingt durch konjugierte Doppelbindungen, der Bestimmung mit dem ECD zugänglich wird. Mittlerweile wurden eine ganze Reihe von Prostaglandinderivaten dargestellt, welche Halogenatome enthalten. Einen ausführlichen Überblick gibt Fitzpatrick (47).

Ein Durchbruch in der Anwendung der Gaschromatographie als analytischer Methode in der Prostaglandinforschung wurde durch den Einsatz von Glaskapillarsäulen erreicht (48). Kapillarsäulen finden seit geraumer Zeit mit viel Erfolg Anwendung auf petrochemischem Gebiet und in steigendem Masse auch für biochemische Fragestellungen. Es handelt sich dabei um Kapillar-

rohre aus Glas, deren Innenseite mit einem dünnen Film einer Stationärphase belegt ist. Ihre große Überlegenheit gegenüber gepackten Säulen verdanken Kapillarsäulen dem Umstand, dass sie in ihrer Länge weitaus weniger begrenzt sind. Gepackte Säulen sind mit Trägermaterial gefüllt, was zur Folge hat, dass das Trägergas (mobile Phase) nicht laminar strömen kann. Ein Abfallen des Drucks vom Anfang zum Ende der Säule ist die Folge. Überschreitet die Säule eine gewisse Länge, so wird der Druckabfall so gross, daß praktisch kein Gasfluss mehr stattfindet. Kapillaren mit ihrem offenen Rohr sind in dieser Beziehung weniger beschränkt. Das Trägergas durchströmt die Säule ungehindert und man erhält über die Säule hinweg nur einen sehr geringen Druckabfall. Kapillarsäulen können deshalb wesentlich länger ausgelegt sein als gepackte Säulen. Es werden nicht selten Säulen eingesetzt, die eine Länge von 150 m oder mehr haben. Selbst bei gleicher Trennkapazität (pro Längeneinheit) ist deshalb eine Kapillare jederzeit einer gepackten Säule weit überlegen.

Mit der enormen Trennleistung der Kapillaren erhält man in geeigneten Geräten eine Empfindlichkeit, die jene von gepackten Säulen bis um das Hundertfache überschreiten kann. Aufgrund der vielen Verteilungsvorgänge werden die einzelnen Probenkomponenten auf ein sehr kleines Volumen konzentriert, durchfliessen den Detektor wesentlich schneller als dies mit einer gepackten Säule der Fall wäre und ergeben schmalere, intensivere Signale. Man konnte deshalb selbst mit den relativ unempfindlichen Flammenionisationsdetektoren komplexe Prostaglandingemische auftrennen und in biologischen Proben quantitativ bestimmen. Sind allerdings Probleme zu lösen, bei denen Konzentrationen unter 5 ng/ml in kleinen Probenvolumen zu bestimmen sind, verspricht die weitaus sensitivere Methode der gekoppelten Gaschromatographie-Massenspektroskopie mehr Aussicht auf Erfolg als die reine Gaschromatographie.

Die Stärke der Gaschromatographie mit Glaskapillaren besteht darin, daß sie mehrere Gesichtspunkte vereinigt:
Sämtliche in einem Gemisch vorhandenen Komponenten, die gaschromatographisch erfassbar sind, können gleichzeitig aufgetrennt, detektiert und quantifiziert werden. Darüberhinaus erhält man durch die Retentionszeiten Informationen über die Identität der einzelnen Komponenten.

2.4. Prostaglandine als Mediatoren von LPS-Wirkungen

Die Rolle von Prostaglandinen als Mediatoren von LPS-Wirkungen konnte in den letzten Jahren für einige endotoxininduzierte Phänomene nachgewiesen werden.
Die Beteiligung von Prostaglandinen in solchen Prozessen kann dann als gesichert gelten, wenn der untersuchte LPS-Effekt mit einem Hemmstoff der PG-Synthese unterdrückt werden kann, wenn der LPS-Effekt durch Prostaglandine auslösbar ist und das aktive Prostaglandin (oder ein Metabolit) in entsprechenden Gewebshomogenaten bzw. dem Serum oder anderen physiologischen Flüssigkeiten festgestellt werden kann und mit derselben Kinetik ansteigt, wie der LPS-Effekt. Darüberhinaus sollten spezifische Prostaglandin-Antagonisten sowohl die LPS-, wie auch die PG-Wirkung verhindern können. Diese Kriterien wurden in einigen Systemen erfüllt: LPS-induziertes Fieber (49,53,63,69), Abort (50), die Beschleunigung des Eitransports (51) und die frühe Phase im Endotoxinschock (52). Durch systematische Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (53) ergab sich für LPS-induziertes Fieber folgendes Bild:
Im Verlaufe von Fieber, welches durch intravenöse oder intraventrikuläre Injektion von Lipoid A induziert werden kann, wurden im Liquor von Versuchstieren signifikant erhöhte Mengen an PGE_2 gefunden. Injektion von

Prostaglandinen der E-Serie in die cerebralen Ventrikel oder Hypothalamus führten zu Fieber. Durch Behandlung der Versuchstiere mit Indomethacin schließlich konnte das Fieber verhindert und die Synthese von Prostaglandinen unterdrückt werden. Diese Befunde legen eine Funktion von PGE_2 bzw. PGE_1 als Mediatoren von LPS-Fieber nahe. Es ist jedoch möglich, dass die physiologischen Mediatoren andere als PGE's sind. Induzierte man Fieber mit dem Natriumsalz der Arachidonsäure, konnte dieses nur zu einem kleinen Teil mit PGE-spezifischen Antagonisten unterdrückt werden (24). Wurde anstatt der PGE-Antagonisten jedoch Indomethacin eingesetzt, konnte die Entstehung des Fiebers verhindert werden. Es wird deshalb angenommen, dass andere Cyclooxygenaseprodukte (s. Abb. 2) die eigentlichen Fiebermediatoren darstellen.

Es lagen somit sichere Hinweise auf die Prostaglandine als Mediatoren bestimmter Endotoxin-verursachter Prozesse vor, unbekannt war aber die Quelle der Prostaglandinproduktion, die durch Lipopolysaccharide aktiviert wird.

2.5. Die Rolle der Makrophagen bei LPS-Wirkungen

Seit geraumer Zeit wurde angenommen, dass das Retikuloendothelialsystem (RES) als primärer Speicherort für Endotoxin, welches Versuchstieren in den Kreislauf injiziert wird, dient (54,55). Weiterhin wurde vermutet, dass Zellen des RES für eine Detoxifizierung des LPS sorgen (56). In diesen Untersuchungen wurde dem Makrophagen die Hauptrolle bei diesem Vorgang zugeschrieben. Inkubation mit Makrophagen führte zum weitgehenden Verlust der letalen Wirkung von LPS (57). Durch Einsatz radioaktiv markierten Endotoxins konnte weiter nachgewiesen werden, dass das LPS bei diesem Vorgang durch den Makrophagen degradiert wurde (57). In der Kapazität,

Endotoxin auf diese Art zu detoxifizieren, erwies sich eine Kombination von LPS-Antiserum und Makrophagen als besonders wirksam. Makrophagen wurden folglich als Fresszellen gesehen, die in der Lage sind, LPS zu phagozytieren und chemisch so zu modifizieren, dass es für den Organismus unschädlich ist.

In neuerer Zeit wurden allerdings eine Reihe von Beobachtungen gemacht, die die Rolle der Makrophagen im Zusammenhang mit Endotoxinwirkungen in ganz anderem Licht erscheinen lassen. Durch in vivo Untersuchungen stellte Agarwal 1972 (58) fest, dass die letale Wirkung von LPS durch Splenectomy der Tiere reduziert werden konnte. Damit war ein erster Hinweis darauf gegeben, dass die Rolle des RES bei LPS-Effekten nicht in erster Linie in der Detoxifizierung, sondern vielmehr in der Vermittlung von LPS-Wirkungen besteht.

Jüngere Untersuchungen mit Endotoxin unempfindlichen C3H/HeJ Mäusen zeigten, dass diese durch den adoptiven Transfer von Milzzellen, die aus endotoxin-sensitiven C3H/HeN Mäusen stammten, für LPS-Letalität empfindlich gemacht werden konnten (59). Rosenstreich et al. (60) machten für diese Aktivität die Makrophagen aus den Donormilzen der C3H/HeN-Spender verantwortlich.

Durch in vitro Untersuchungen wurde weiterhin klar, dass Makrophagen durch LPS zur Bildung und Sekretion eines ganzen Spektrums von Substanzen angeregt werden können, durch welche diese Zelle steuernd in Funktionen von umgebenden Zellen und Geweben eingreifen kann. LPS verursacht in Makrophagenkulturen nicht nur eine Aktivierung der Zelle, welche sich in der Steigerung der Phagozytischen Kapazität (61) und der Synthese lysosomaler Enzyme (62) äussert: LPS induziert in diesen Zellen ausserdem die Synthese und Freisetzung coagulierender Substanzen, Collagenase, endogene Pyrogene,

Prostaglandine, Interferon und andere Faktoren, die u.a. cytotoxisch oder cytolytisch für Tumorzellen sind. Besonders hervorzuheben ist die Empfindlichkeit, mit der Makrophagen schon auf geringste Mengen Endotoxin antworten. Der grösste Teil der Reaktionen in vitro erfolgt auf eine Stimulation mit Endotoxinmengen im Submikrogrammbereich. Diese Empfindlichkeit weist auf eine entscheidende Rolle hin, die Makrophagen in der Vermittlung von LPS-Wirkungen in vivo spielen (63).

In einer Serie von Versuchen konnten Wahl et al. (64) zeigen, dass die durch LPS stimulierte Produktion von Collagenase in Makrophagen von Prostaglandin E kontrolliert wird, das ebenso von der Zelle unter der Einwirkung von LPS gebildet wird. Zugabe von Indomethacin hemmt die Collagenase Produktion, während sie durch Zugabe von Prostaglandin E_2 gesteigert wurde (65). Makrophagen beeinflussen durch Prostaglandinbildung die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen-Vorläuferzellen (66). Sie können damit einer andere Makrophagenaktivität, welche die Kolonienbildung von Monozyten aktiviert (Colony Stimulating Activity, CSA) antagonisieren. Beide Aktivitäten werden von LPS stimuliert. Diese Befunde weisen auf eine bedeutende Rolle der Prostaglandine in der Selbstregulation der Zellfunktionen von Makrophagen hin und unterstreichen die Schlüsselstellung der Makrophagen im zellvermittelten Abwehrgeschehen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Kulturmedien und Puffer

1) Eagles Medium

L-Cystein	0,129	g
L-Tyrosin	0,288	g
$NaHCO_3$	14,8	g
NaCL	25,6	g
KCL	1,6	g
$CaCL_2$	0,8	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,8	g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,5	g
Inositol	0,028	g
D-Glucose	18,0	g
Penicillin	4×10^5	E
L-Glutamin	2,33	g
Benztraubensäure	0,44	g

in 4l destilliertem Wasser lösen

2) L-cell conditioned Medium

L-cell conditioned Medium wurde von Frau Dr. Lohmann-Matthes MPI Immunbiologie zur Verfügung gestellt. Dieses Medium besteht aus einem Überstand von einer Fibroblastenlinie (L 292).

3) Fötales Kälberserum (FCS)

FCS wurde von der Firma Seromed (München) bezogen. Vor der Verwendung wurde FCS 30 min. bei 56°C inaktiviert.

4) PBS-Puffer

NaCl	72	g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	12,46	g
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	2,76	g

in 9l destilliertem Wasser lösen

5) GPBS-Puffer

PBS s(2) + 0,1 Gewichts% Gelatine

6) Citrat-Puffer

Citronensäure 8,41 g

in 200 ml destilliertem Wasser auflösen

mit NaOH auf pH 4,6 einstellen

3.2. Lipopolysaccharide, bakterielle Proteine und Zymosan

1) LPS

Es wurden folgende Lipopolysaccharide verwendet:

		Referenz
Salmonella minnesota S (Glattform)	LPS	(67)
Salmonella minnesota Re (Rauhform)	LPS	(68)
ReLPS (Phtalyl)		(69)
Lipoid A x BSA		(70)
LPS-OH		(71)
Lipoid A-OH		
Lipoid A-TEA	von Dr. Galanos (MPI f. Immunbiologie)	

Lipopolysaccharid aus Wildtyp Bakterien (S.minnesota) wurden mit Phenol-Wasser extrahiert (72). LPS aus der Salmonella minnesota Re Mutante R 595 wurde mit Phenol-Chloroform-Petroläther extrahiert (73), einer Elektrodialyse unterzogen (74) und in die Triäthylamin Salzform überführt (74) (mReLPS-ED-TEA).

2) Proteine

Lipid A-associated protein (LAP II) wurde freundlicherweise von Dr. D.C. Morrison (Scripps Clinic La Jolla), "Endotoxin-Protein" (EP aus E.coli 0127:B8) von Dr. B. Sultzer (States University of New York, N.Y.) und Braunsches Lipoprotein (FLP-SW 2 aus E.coli) von Dr. W. Bessler (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

3) Stammlösungen von LPS und Protein

Lipopolysaccharide wurden in pyrogenfreiem, bidestilliertem Wasser (oder gelegentlich in pyrogenfreiem PBS) suspendiert (1 mg/ml), im Ultraschallbad (Poly-Son, 80 KHz, 50 W, Bachofer) beschallt, erhitzt, (100°C, 2-3 min.) und wieder solange beschallt, bis sich eine nahezu klare oder leicht opaleszente (entsprechend der Löslichkeit des LPS) Lösung ergab.

mReLPS-ED-TEA wurde im Anschluß daran durch Milliporefilter (Millipore S.A. France) sterilfiltriert.

Protein wurde ebenfalls in pyrogenfreiem, bidestilliertem Wasser aufgenommen (1 mg/ml) und mit Ausnahme der Erhitzung auf die gleiche Art gelöst.

4)a Zymosan

Zymosan (partikuläre Hefezellwände) wurde von ICN Pharmaceutical Inc. (Plainview, N.Y.) bezogen. Für biologische Versuche wurde es in Eagles Medium (50 mg/ml) suspendiert.

b) Fluoreszenzmarkiertes Zymosan

Fluoreszenzmarkiertes Zymosan wurde freundlicherweise von Frau R.L.

Oropeza-Rendon zur Verfügung gestellt (75). Es handelt sich dabei um Zymosan, an welches Flurescein kovalent (Isothiocyanat-Methode) gekoppelt wurde.

3.3. Fettsäuren, Prostaglandine, Indomethacin

1) Es wurden folgende Substanzen verwendet:

3-OH-Myristinsäure	(synthetisiert von Dr. E. Rietschel)
Palmitinsäure	(Serva)
Stearinsäure	(Serva)
Arachidonsäure	(Serva)
2-OH-Lignocerinsäure	(Applied Science)
PGE_1, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	(Serva)
TxB_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	wurden freundlicherweise von Dr. J. Pike (Upjohn Company Kalamzoo) zur Verfügung gestellt.
$6kPGF_{1\alpha}$	wurde freundlicherweise von Dr. Peskar (Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.
Indomethacin	(Amuno-Kapseln, Sharp und Dohme)

2) Fettsäuren und Indomethacin wurden wie folgt gelöst:

Lösung 1:	Na_2HPO_4	0,5 M
Lösung 2:	NaH_2PO_4	0,5 M

10 mg der zu lösenden Substanz wurden in 1,62 ml der Lösung 1 gelöst. Es wurden danach 0,38 ml Lösung 2 und 8,0 ml pyrogenfreies Wasser zugegeben.

Die 3-Hydroxymyristinsäure wurde auf dieselbe Art gelöst, musste aber in Lösung 1 im Ultraschallbad beschallt werden. Um die Arachidonsäure vor Oxidation zu schützen wurde sie in ein steriles, verschlossenes Serumgläschen mit einer Injektionsspritze über ein Sterilfilter überführt.

Das Serumgläschen wurde über zwei Kanülen mit einem Stickstoffstrom, der durch ein Sterilfilter geleitet wurde 30 min. begast. Die Lösung wurde im Dunkeln (Alufolie) bei -20°C gelagert.

Die anderen Fettsäuren lösten sich auch nach Beschallen nicht in Lösung 1. Es wurde deshalb soviel 2N NaOH zugegeben, bis eine klare Lösung entstand. Nach Zugabe von Lösung 2 und 7 ml Wasser wurde der pH-Wert mit 1n HCL auf 7.2 eingestellt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

Die fertigen Lösungen wurden über Sterilfilter in sterile Serumgläschen überführt.

3.4. Tiere

NMRI-Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen) wurden vom Tierstall des Institutes bezogen.

C3H/HeJ und C3H/HeSwSn Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen) wurden ebenfalls aus der Zucht des Max-Planck-Institutes f. Immunbiologie zur Verfügung gestellt.

3.5. Induktion von LPS-Hyperreaktivität und LPS-Toleranz

LPS-Hyperreaktivität und Toleranz wurden in NMRI-Mäusen nach der Methode von Greer und Rietschel induziert (75). Es wurden Gruppen von Mäusen mit einer Dosis von 10 ug pro Maus (i.v.) vorbehandelt . 24 Stunden später befinden sich die Mäuse im hyperreaktiven Stadium, was durch eine geringe LD_{50} angezeigt wurde. 4 Tage nach der Vorbehandlung befinden sich die Mäuse im Stadium der Toleranz, was durch eine hohe LD_{50} angezeigt wurde.

3.6. Gewinnung von Makrophagen

1) Knochenmarkmakrophagen

Knochenmarkmakrophagen wurden von Frau Dr. Lohmann-Matthes (MPI für Immunbiologie, Freiburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (76). Die aus dem Knochenmark von Femur und Tibia (C57 bl 6-Mäuse) gewonnenen Vorläuferzellen wurden in Gegenwart von L-Zell-konditioniertem Medium (Fibroblasten L 292) über 7 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit fanden sich in solchen Kulturen fast ausschließlich leicht adhärierende Makrophagen. Die Zellen wurden mit einer Injektionsspritze von den Kulturschalen losgelöst, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und vor dem Experiment in Eagles Medium in der gewünschten Anzahl für zwei Stunden inkubiert.

2) Peritonealmakrophagen

Material: Tiere: Weibliche NMRI Mäuse, 6-8 Wochen

Ausspülmedium: Eagles Medium mit 10% fötalem Kälberserum

Neubauer Zählkammer

Inkubationsgefäße: Costar Culture Cluster (Costar, Hüttenberg)

Durchführung:

Mäuse wurden durch Äthereinwirkung getötet und in einer sterilen Werkbank mit Injektionsnadeln auf Korkplatten befestigt. Nach einem Schnitt in das Fell wurde dieses über dem Abdominal- und Bauchbereich abgezogen und Ausspülmedium (5 ml) in die Peritonealhöhle injiziert. Um am Gewebe anhaftende Zellen abzulösen, wurde das gefüllte Peritoneum ca. eine Minute

leicht mit zwei Fingern massiert, die die Zellen enthaltende Flüssigkeit mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Peritonealraum abgesaugt und in der Neubauer-Zählkammer die Anzahl der Zellen im Ausspülmedium bestimmt. Die einer Mio.-Zellen entsprechende Flüssigkeitsmenge wurde in jede Vertiefung eines "Culture Cluster" gegeben und bei Bedarf mit Medium auf einen Milliliter aufgefüllt. Um Makrophagenkulturen zu erhalten, die mit möglichst wenig anderen Zelltypen verunreinigt waren, wurden die Kulturgefässe für 3-4 Stunden bei 37°C in 8%-iger CO_2-Atmosphäre aufbewahrt. Die Makrophagen adhärierten in dieser Zeit an die Plastikböden der Kulturgefässe, sodass andere Zelltypen nach dieser Zeit leicht durch Abspülen entfernt werden konnten. Nach dreimaligem Waschen mit warmen (37°C) PBS (Phosphate buffered saline), und Zugabe von serumfreien Eagles Medium (1 ml) standen die Zellen nach etwa einer Stunde Ruhe zum Experiment bereit. Zellen anderer Mausstämme wurden auf dieselbe Art präpariert.

3.7. Gewinnung von Milzzellen aus der Maus

Material: NMRI-Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen)
Potter (5 ml Braun, Melsungen)

Durchführung:

Den Mäusen wurden die Milzen entnommen, mit einer sterilen Schere zerkleinert, und jeweils drei Milzen in einem Potter in 5 ml Eagles Medium homogenisiert.

Die Milzhomogenate wurden in sterile Petrischalen überführt, wo sie 20 min. absitzen konnten. Nach dieser Zeit wurden die Überstände abdekantiert, die verbleibenden Zellen mit einer Injektionsspritze und Eagles Medium abgelöst und diese Zellsuspension in einer Hettich Tischzentrifuge (10 min., 2000 Upm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen erneut in 5 ml

Eagles Medium aufgeschlemmt und wiederum zentrifugiert. Danach wurde die Zellzahl in der Suspension bestimmt und die Zellen in kleinen Petrischalen (Ø 3,5 cm) inkubiert (1 x 10^6 Zellen pro ml).

3.8. Granulozyten vom Rind

Granulozyten von Rindern (Schlachthaus Freiburg) wurden freundlicherweise von Herrn B. Schmitz (MPI f. Immunbiologie Freiburg) zur Verfügung gestellt.

3.9. Inkubation der Zellen mit LPS

Material: Zellen: s. 3.6.

LPS : s. 3.2.

Durchführung:

Zur Stimulation der Prostaglandinsynthese der Zellen wurde, wenn nicht anders spezifiziert, die einheitliche elektrodialysierte Triäthylaminsalzform des Lipopolysaccharids aus der Salmonella Re-Mutante R595 verwendet.

Es handelt sich hierbei um ein hochgereinigtes, proteinfreies LPS, welches den Vorteil mit sich bringt, dass es aufgrund guter Wasserlöslichkeit steril filtrierbar ist, ohne an biologischer Aktivität zu verlieren.

Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden bei 37°C und 8% CO_2 Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Sollten die Überstände der Zellen im Radioimmunassay getestet werden, wurde der Ansatz in Inkubationsgefässen (Costar Culture-Cluster) mit 1 ml Kulturmedium und 1 x 10^6 Zellen durchgeführt.

Sollte der Zellüberstand gaschromatographisch analysiert werden, wurden jeweils 30 x 10^6 Zellen in Kulturflaschen (Saarstedt) in 20 ml Kulturmedium mit 300 ug LPS für 24 Stunden inkubiert.

Alle anderen Lipopolysaccharide und Proteine wurden in derselben Weise mit Zellen inkubiert.

3.10. Inkubation der Zellen mit Zymosan

Material:

Zellen : s. 3.6.

Zymosan : ICN Pharmaceutical Inc.
(Plainview N.Y.)
50 mg/ml (Eagles Medium)

Inkubationsgefässe: Costar Culture
Cluster (Technorama, Hüttenberg)
Kulturflaschen, Saarstedt

Durchführung:

Makrophagen (wurden mit Zymosan (500 ug pro ml und 1×10^6 Zellen) für 1 Stunde bei 37^0C und 8% CO_2 Gehalt inkubiert. Danach wurde der Überstand in Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Hettich Tischzentrifuge (10 min/3000 upm) zentrifugiert.

Sollten Überstände im Radioimmunoassay getestet werden, wurde die Inkubation in Inkubationsgefässen mit 1 ml Medium durchgeführt (1×10^6 Zellen).

Sollten die Überstände gaschromatographisch analysiert werden, wurde die Inkubation in einem Volumen von 20 ml durchgeführt (Kulturflaschen 30×10^6 Zellen).

3.11. Färbemethoden

3.11.1. Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von LPS auf Makrophagen (Trypanblauausschluss)

Material:

Zellen: Peritonealmakrophagen
s. 3.6.

Trypanblau

Costar Culture Cluster

Durchführung:

Jeweils 1 x 10^6 Zellen wurden in einer Vertiefung der "Culture Cluster" mit verschiedenen Mengen (zwischen 1 und 200 ug) LPS für 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Zellüberstand dekantiert und 0.5 ml einer Trypanblaulösung (0,16% in 0,9% NaCL-Lösung) in jede Vertiefung gegeben. Nach 5 min. wurde diese Lösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit 0,5 ml PBS gewaschen, und unter dem Mikroskop ausgezählt. Von jeder Inkubation wurden 200 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz der Zellen bestimmt, welche Trypanblau aufgenommen hatten.

3.11.2. Anfärbung nach Giemsa

Material: Giemsa-Lösung (Merck)

Methanol

Durchführung:

Peritonealmakrophagen wurden wie unter (3.6.) beschrieben in Petrischalen (Ø 3,5 cm) präpariert. Die Überstände wurden dekantiert und die Zellen wurden für 15 min. in Methanol fixiert. Durch Zugabe von 1,5 ml Giemsa Färbelösung und Inkubation für 10 min. wurden die Zellen angefärbt. Nach Abspülen der Färbelösung mit Leitungswasser konnten die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

3.12. Bestimmung der Phagozytosekapazität von Makrophagen (75)

Material: Zellen: Peritonealmakrophagen

s. 3.6.

Fluoreszenzmarkiertes Zymosan

Sterile Deckgläschen

Durchführung:

Zu diesem Test wurde ein Zymosan verwendet, an das kovalent Fluorescein gekuppelt war. Es wurde freundlicherweise von Frau R.L. Oropeza-Rendon zur Verfügung gestellt. Makrophagen (2 x 10^5 Zellen) in ca. 0,1 ml Ausspülmedium wurden vorsichtig auf ein rundes, steriles Deckglas pipettiert, sodass dessen ganze Fläche bedeckt war. Das Deckglas wurde in eine Petrischale gelegt und im Brutschrank 3-4 Stunden inkubiert, wobei die Makrophagen an die Glasoberfläche adhärierten. Die nicht adhärenten Zellen wurden durch dreimaliges Waschen abgespült. Die adhärenten Makrophagen wurden über Nacht in 2 ml Eagles Medium, das 10% FCS enthielt inkubiert. In diesen Ansatz wurde Zymosan (50 ug/ml in 20 ul Medium) mit einer Eppendorfpipette vorsichtig zugegeben.

Nach einer Inkubationsdauer von 20 min. wurde das Deckgläschen mit einer Pinzette herausgenommen, mit PBS (37°C) 6 mal gewaschen, indem es wiederholt in eine Reihe von vorbereiteten Gläschen mit dem PBS eingetaucht wurde. Danach sollte sich kein Zymosan mehr auf dem Deckgläschen befinden, welches nicht phagozytiert ist oder an die Zellen anhaftet. Die Zellen wurden anschliessend fixiert, indem sie für 15 min. in Methanol belassen wurden. Die getrockneten Deckgläschen wurden auf Objektträger geklebt. Zum Auszählen der Makrophagen wurde ein Mikroskop verwendet, das über einen UV-Lichtstrahl und über eine Lichtquelle mit sichtbarem Licht verfügte. In einem schwachen Strahl mit Licht im sichtbaren Bereich können die Umrisse der Zellen gut erkannt werden, während die Zymosanpartikel mit dem UV-Strahl zur Fluoreszenz angeregt werden und somit gut ausgezählt werden können. An zwei verschiedenen Stellen des Deckgläschens, die in der Nähe des Zentrums lagen, wurden jeweils etwa 100 Zellen ausgezählt, indem einerseits die Anzahl der Zellen die Partikel aufgenommen hatten und andererseits die Anzahl der aufgenommenen Partikel bestimmt wurden.

Partikel, die nicht aufgenommen, sondern nur an die Oberfläche der Zellen angeheftet waren, konnten leicht an ihrem weit stärkeren Fluoreszenzleuchten erkannt werden und wurden nicht mit gezählt.
Aus den erhaltenen Werten wurde ein Phagozytose Index (PI) nach der Formel errechnet.

$$PI = \frac{\text{Phagozytierende Zellen x Phagozytierte Partikel}}{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}$$

3.13. Enzymatische Bestimmungen

3.13.1 Lactatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) (78)

Material: "Monotest" LDH opt. (Boehringer Mannheim)

Durchführung:

Es wurde unter den in der Anleitung der Fa. Boehringer als "Mikrobestimmung" angegebenen Bedingungen gearbeitet. Die LDH-Aktivität wurde aus der Geschwindigkeit der durch die Reaktion hervorgerufenen NADH-Abnahme errechnet.
Innerhalb von 3 Minuten wurde jeweils nach einer Min. die Abnahme der Extinktion bei 365 nm registriert. Der Mittelwert der drei Extinktionsdifferenzen wurde bestimmt und daraus die Aktivität der LDH berechnet nach:

$$U/l = 8118 \times E_{365}$$

U = Units

L = Liter

3.13.2 N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30)

Material: p-nitrophenyl-N-acetyl-ß-D-glucosaminide Fa. Sigma (München)
Citratpuffer 0,2 mol pH 4.6

Durchführung:

Makrophagenüberstand (0.5 ml) wurde bei 37°C für 3 min. vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 ul einer 10 mm Lösung von p-Nitrophenyl-N-acetyl-ß-D-Glucosaminid in Citratpuffer als Substrat gestartet. Die Inkubationszeit betrug 15 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 N NaOH (200 ul) gestoppt. (NaOH inaktiviert das Enzym und stabilisiert das die Reaktion anzeigende Phenolatanion). Gemessen wurde die Extinktion bei 405 nm. Als eine Einheit der N-acetyl-ß-D-Glucosaminidase wird folgende Enzymaktivität bezeichnet:

$$U = \frac{\text{u Mol (Nitrophenol)}}{\text{ml x min x MioZellen}}$$

3.14. Gewinnung und Vorreinigung von Prostaglandinen aus Überständen von Makrophagenkulturen

3.14.1 Extraktionsmethoden

1) Ausschütteln

Material: Scheidetrichter 1l mit Teflonhahn
1N HCL
Essigsäureäthylester zur Rückstandsanalyse
(Fa. Merck)

Durchführung:

Makrophagenüberstände (60 ml) wurden mit 1n HCL auf einen pH-Wert von 3.5 gebracht (pH-Meter). In einem Scheidetrichter wurden die wässrigen Überstände zweimal mit demselben Volumen Essigsäureäthylester (60 ml) 1 min. kräftig geschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden 5 mal mit jeweils 30 ml destilliertem Wasser gewaschen. Zur Abtrennung des verbleibenden Wassers wurde das Gemisch für 10 min. bei 4000 g in einer Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die organische Phase wurde dekantiert

und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (35°C) zur Trockne eingeengt.

2) Extraktion über Extrelutsäulen (79)

Material: Extrelutsäulen (Merck)
1N HCL
Essigsäureäthylester zur Rückstandsanalyse (Fa. Merck)
Isopropanol p.A. (Fa. Merck)

Durchführung:

Makrophagenüberstand der mit HCL auf einen pH-Wert von 3.5 eingestellt war wurde auf eine Extrelutsäule gegeben (20 ml-Portionen). Nach 15-20 min. war dieses Volumen in das körnige Material eingezogen. Mit 40 ml eines Gemisches aus Essigsäureäthylester und Isopropanol (85 / 15, v/v) wurde eluiert. Das klare und wasserfreie Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

3) Quantifizierung des Extraktionsverfahren

Um die Ausbeuten der einzelnen Schritte des Isolierungsverfahrens verfolgen zu können, wurde zu den Makrophagenüberständen zu Beginn eine kleine Menge tritiummarkierten Prostaglandins (PGE_2 oder $PGF_{2\alpha}$) zugegeben. Die Menge musste so gewählt sein, dass sie nicht im gaschromatographischen Analysenverfahren detektierbar war, aufgrund der hohen spezifischen Aktivität durch Flüssigkeitsscintillationsmessung aber noch verfolgt werden konnte. Durch Vergleich der am Ende der Aufarbeitung verbleibenden Radioaktivität mit der eingesetzten Aktivität konnte die gaschromatographisch bestimmte Menge der einzelnen Prostaglandine leicht und genau auf die ursprünglich vorhandene Menge zurückgerechnet werden. Es wurden zwischen

6000-8000 cpm/60 ml eingesetzt.

3.14.2. Flüssigkeitschromatographie

3.14.2.1. Chromatographie an Kieselsäure (80)

Material:

Kieselsäure der Korngröße mesh 100-200 (Silicic Acid Sigma)

Essigsäureäthylester zur Rückstandsanalyse (Merck)

Benzol (Baker, analysed)

Methanol p.A. "getrocknet" (Merck)

Glassäulen 20 cm Länge
0,5 cm Ø

1 % Dimethylchlorsilan (Applied Science in Heptan für die Chromatographie (Merck)

Durchführung:

Vorbereitung der Säulen:

Kieselsäure (0,5 g) wurde für 1 Stunde bei 110°C im Trockenschrank aktiviert und zum Abkühlen in einen Exsikkator gestellt. Die Kieselsäure wurde in 4 ml Lösungsmittel 1 aufgenommen (s. Tab. 1). Um die Aufschlemmung von Blasen zu befreien, wurde sie solange in ein Ultraschallbad gestellt, bis alle Blasen entfernt waren. Die Glassäulen wurden mit einer Lösung von 1% Dimethylchlorsilan in Hexan ausgespült und im Exsikkator getrocknet und am unteren Ende mit einem Stopfen aus sylilierter Glaswolle versehen. Auf die ausgezogene Spitze wurde ein Teflonschlauch gezogen, sodass die Säule durch Aufstecken einer umgebogenen Injektionsnadel verschlossen werden konnte. Die Säule wurde bis zum oberen Ende mit Lösungsmittel 1 gefüllt und die

Kieselsäureaufschlemmung mit einer Pasteurpipette aufgegeben. Nachdem sich die Kieselsäure gesetzt hatte, und die darüber stehende Flüssigkeit abgelaufen war, wurde die Säule mit 5 ml Lösungsmittel 3 und anschliessend mit 5 ml Lösungsmittel 1 gespült.

Trennung der Prostaglandine (Gruppentrennung an Kieselsäure):

Die zu chromatographierende Probe wurde in einem Gemisch von 0,2 ml Lösungsmittel 4 und 0,8 ml Lösungsmittel 1 aufgenommen und auf die Säule gegeben. Nachdem diese Menge eingezogen war, wurden die Prostaglandine mit den in Tabelle 1 aufgeführten Lösungsmitteln nach Gruppen eluiert.

Tabelle 1: Lösungsmittel zur Gruppentrennung der PG an Kieselsäure

Lösung Nr.	Eluiertes PG	Volumenteile Benzol	Volumenteile Äthylacetat	Volumenteile Methanol	ml
1	A, B [1)]	60	40	-	6
2	E	60	40	2	12
3	F	60	40	20	3
4	-	60	40	10	-

1) A,B : Prostaglandine A,B
E : Prostaglandine E, TxB_2
F : " F, 6 K $PGF_{1\alpha}$

3.14.2.2. Chromatographie an Sephadex LH 20 (81)

Material:

Sephadex LH 20 (Pharmacia)

Glassäulen mit Teflonstempeln SR 50/50J (Pharmacia) 100 cm Länge 1 cm Ø mit Kühlmantel

Heptan für die Chromatographie (Merck)

Chloroform Rothipuran (Roth)

Methanol p.A. wasserfrei (Merck)

Durchführung:

Vorbereitung der Säulen.

Sephadex LH 20 wurde nach dem Von Åanggard (81) beschriebenen Verfahren verwendet. Sephadex LH 20 (40 g) wurde zur Reinigung in Methanol:Chloroform (1:1) (12) aufgenommen. Diese Aufschlemmung wurde für 3 Stunden belassen, das Lösungsmittelgemisch zunächst abdekantiert und schließlich in einem Büchnertrichter abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde das Gel in ein Gemisch von Chloroform:Heptan:Äthanol (10/10/1,v/v/v) überführt und für 5 Stunden belassen. Danach wurde es am Wasserstrahlvakuum entgast. In die am unteren Ende mit Teflonstempeln verschlossenen Glassäulen wurde das Lösungsmittelgemisch bis zur Hälfte der Säule eingefüllt. Das Gel wurde in die so vorbereitete Säule gegeben und konnte sich ohne Durchfluß absetzten. Hatte sich eine Gelsäule von ca. 60 cm gebildet, so wurde die Glassäule auch am oberen Ende verschlossen und über einen Teflonschlauch (1 mm Durchmesser) mit einem Vorratsgefäß verbunden. Das untere Ende der Säule war über einen Teflonschlauch an den Tropfenzähler eines Fraktionssammlers angeschlossen.

Elution der Prostaglandine (Gruppentrennung an Sephadex LH 20)

Die hydrophobe Chromatographie an Sephadex LH 20 wurde mit den Methylestern der Prostaglandine durchgeführt (Darstellung s. 3.15.1.). Der Säulendurchfluss betrug 0,16 ml pro Minute, das Fraktionsvolumen 1,4 ml. Es wurde bei einer konstanten Temperatur von 21°C chromatographiert.

Folgende Fraktionen wurden in Gruppen zusammengefasst:

Gruppe PG<u>A</u>: Fraktionen 1-26, Gruppe PG<u>E</u>: Fraktionen 27-37, Gruppe PG<u>F</u>: Fraktionen 38-48.

3.15. Derivate für die Gaschromatographie

3.15.1. Prostaglandin-Methlyester

Die Carbomethylierung der Prostaglandine wurde mit Diazomethan durchgeführt.

1) Darstellung des Diazomethans (Organikum)

Material:

Nitrosomethylharnstoff (eigene Herstellung, Organikum)

Destillationsapparatur ohne Schliff

Äther (Peroxidfrei Merck)

Methanol p.A. (getrocknet Merck)

Durchführung:

In einem Vorratsgefäss im Eisbad, das an ein Destillationsrohr angeschlossen war, wurde Nitrosomethylharnstoff (2 g in 10 ml Äther gelöst) zu einer äthanolischen KOH-Lösung (3 g KOH in 15 ml Äthanol 96 %). Das entstehende Diazomethan wurde über das Rohr in eine Vorlage geleitet, welche 15 ml Äther enthielt. Eine zweite Vorlage war nachgeschaltet, sodass sich dort eventuell nicht in der ersten Vorlage aufgefangenes Diazomethan lösen konnte. Die beschriebene Reaktion muss mit einer schliffreien Apparatur (Explosionsgefahr) und im Abzug durchgeführt werden. Die dabei notwendigen Manipulationen müssen mit Handschuhen durchgeführt werden, da sowohl Diazomethan als auch Nitrosomethylharnstoff cancerogen wirken.

2) Carbomethylierung der Prostaglandine

Material:

"Reacti-Vials" (1 ml Pierce)

Diazomethan (s. 3.15.1.)

Rückstände aus (3.14.1.) und (3.14.2.)

Durchführung:

Die Rückstände wurden mit 0,3 ml Äthylacetat in die "Reacti-Vials" überführt, unter einem leichten Stickstoffstrom evaporiert, in 20 ul trockenem Methanol gelöst und mit 100 ul der Diazomethanlösung versetzt. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur für 10 min. stehen gelassen. Mit einem leichten Stickstoffstrom wurde das überschüssige Diazomethan und der Äther entfernt.

3.15.2 Oximierung der Prostaglandin-Methylester

Material:

O-Methylhydroxylamin Hydrochlorid (Sigma 2 x umkristallisiert)

O-n-Butylhydroxylamin Hydrochlorid (Applied Science)

Pyridin p.A. getrocknet (Merck über Molekularsieb getrocknet).

"Mini-Inert-Valves" (Pierce)

Durchführung:

Die zu oximierenden (methylierten) und getrockneten PG-Proben wurden mit 30 ul einer Lösung des Alkylhydroxylamins in Pyridin (30 mg/ml) über Nacht in gut verschlossenen Reacti-Vials ("Mini-Inert-Valves") inkubiert.

3.15.3. Trimethylsilylierung der oximierten PG-Methylester

Reagens: N,N-Bis(Trimethylsilyl)Trifluoracetamid (BSTFA, Sigma)

Durchführung:

Die methylierten und oximierten Proben wurden unter einem leichten Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt. Die trockenen Proben wurden in Äther

(1 ml) gelöst und für 3 min. in ein Ultraschallbad gestellt. Nach dieser Zeit wurde der Ätherüberstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen, in Reacti-Vials überführt und erneut unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Zur Silylierung wurden die Proben mit BSTFA (50 ul) versetzt und für 2 Stunden bei 50°C oder für 12-14 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Den Proben wurde als innerer Standard 200 ng Dotriacontan ($C_{32}H_{66}$) zugegeben.

3.16. Gaschromatographie

Gaschromatographie wurde mit folgenden Geräten durchgeführt: Varian GC 3700, Varian GC 2400, Varian GC 1400. Die beschriebenen Derivate der Prostaglandine (Methylester, Alkyloxime, Trimethylsilyläther) sind einer gaschromatographischen Analyse zugänglich. Für ihre Bestimmung wurden verschiedene flüssige Phasen und Säulensysteme getestet.

3.16.1. Gepackte Säulen

Bei dieser gaschromatographischen Methode wird die flüssige Phase auf ein Trägermaterial aufgebracht, welches aus Körnern einheitlicher Grösse besteht. Sie werden aus Diatomeenerden gewonnen und weisen eine besonders grosse Oberfläche auf. Durch Säure- und Alkalibehandlung sowie Silylierung des Materials erhält man einen Träger für die flüssige Phase, welcher weitgehend inert ist. Für die Gaschromatographie der Prostaglandine benötigt man temperaturstabile Phasen, wie sie hauptsächlich in Form der Silikonöle zur Verfügung stehen.

Als Phasen für Prostaglandinanalysen wurden eingesetzt:

- Silar 10 C (polare Phase)
- OV 1
- SE 30 (unpolare Phasen)

1) Belegung des Trägermaterials gepackter Säulen

Material:

Trägermaterial: Gaschrom Q 100-200 mesh (Fa. Applied Sience)

Flüssige Phasen:
SE 30, OV1, Silar 10C
(Fa. Appl. Science)

Durchführung:

Die Belegung erfolgte für OV1 3%-ig, für SE 30 und Silar 10C 10%-ig. Die flüssige Phase wurde in einem grossen Volumen Lösungsmittel (300 ml Chloroform) aufgenommen. Nachdem sie vollständig gelöst war, wurde das abgewogene Trägermaterial zugegeben und es wurde am Wasserstrahlvakuum eingeengt. Um eine mechanische Zerstörung des Materials weitgehend zu verhindern wurde dies nicht am Rotationsverdampfer durchgeführt. Der die Aufschlemmung enthaltende Kolben wurde lediglich manuell in handwarmem Wasser leicht bewegt. Auf diese Weise wurde der grösste Teil des Lösungsmittel evaporiert; der Rest wurde entfernt, indem das Material über mehrere Stunden bei 70°C im Trockenschrank stand. Eine sehr gute Belegung der Säulen wurde durch eine Vorbelegung des Trägermaterials mit 0,3-0,5 % konzentrierter Schwefelsäure erhalten.

2) Vorbehandlung und Packen der Glassäulen.

Säulen: Duranglas, Länge 150 cm, Aussendurchmesser 8 mm, Innendurchmesser 4 mm

Die Silyläther der Prostaglandine zersetzen sich sehr leicht durch Kontakt mit katalytisch aktiven Oberflächen. Metallrohre als GC-Säulen kommen daher nicht in Frage. Es wurde aus diesem Grund ausschliesslich mit

Duranglassäulen gearbeitet. Um eventuelle aktive Zentren insbesondere Hydroxylfunktionen auf der Glasoberfläche auszuschalten, mussten die Säulen vorbehandelt werden. Sie wurden deshalb zunächst mit 1 n HCL gewaschen, mit Aqua bidest gespült, mit 1 n NaOH gewaschen, erneut mit Aqua bidest gewaschen und schliesslich gründlich mit Aceton gespült. Das Glasrohr wurde im GC-Ofen installiert, ein Stickstoffstrom von 3-5 ml pro min. eingestellt und Ofen sowie Säule auf eine Temperatur von 120°C gebracht. Unter diesen Bedingungen wurden mehrere Einspritzungen von jeweils 10 ul BSTFA vorgenommen. Die Säule blieb für 20 min. im Ofen. Nachdem sie herausgenommen und abgekühlt war, wurde die Säule am einen Ende mit einem Glaswollpropf verschlossen und die vorbereitete Phase auf dem Trägermaterial mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch einen Trichter in die Säule gesogen. Die Säule wurde in den GC-Ofen eingebaut und ein Stickstoffstrom von 8-10 ml auf die Säule gegeben. Der Ofen wurde auf 100°C aufgeheizt und bei dieser Temperatur für ca. 1 Stunde belassen, um letzte Lösungsmittelreste zu entfernen. Die Säule wurde über Nacht "gealtert", d.h. sie wurde bei Maximaltemperatur ohne Gasdurchfluss ausgeheizt. Danach wurde die Säule "konditioniert", indem sie für 24 Stunden bei einer Temperatur von 20°C unter der Maximaltemperatur bei einem Trägergasstrom von 8-10 ml pro min. ausgeheizt wurde. Um letzte aktive Zentren auf der Säule zu beseitigen, wurden nach dieser Prozedur 4-5 Injektionen von je 5 ul BSTFA bei Analysentemperatur auf die Säule dosiert. Danach standen diese für die Analysen bereit.

3.16.2. Glaskapillarsäulen

Als weitere gaschromatographische Methode wurden Glaskapillarsäulen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um dünne Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm und einer Länge von 25 m. Die flüssige Phase wird

hier nicht auf ein Trägermaterial aufgezogen, das sich im Innern der Säule befindet, sondern sie wird als dünner Film auf die Innenwand des Glasrohres gebracht.

Belegte Glaskapillaren wurden von der Fa. Varian (OV 101) und von Herrn Ing. Wehke in Mühlheim/Ruhr (SE 54, Silar 5C). Letztere bestehen aus Duranglas; sie sind gegenüber AR-Glassäulen wesentlich leichter zu handhaben, indem sie z.B. nicht so schnell schmelzen, darüber hinaus haben sie eine weitaus inaktivere Oberfläche, sodass trimethylsilylierte Substanzen weniger zersetzt werden (124).

Die Kapillarsäulen wurden in einem Gaschromatograph 3700 installiert, welcher speziell für den Betrieb mit Kapillaren ausgelegt war.

3.16.3. Injektionsverfahren

1) Injektion auf gepackte Säulen

Durch ein selbstdichtendes Septum wurde die Probe in einer Hamiltonspritze auf die Säule injiziert. Das Volumen betrug zwischen 0,1 und 1 ul.

2) Strömungsgeteilte Injektion bei Kapillaren (85)

Die Probemenge wurde mit Hilfe einer 10 ul Hamiltonspritze durch das selbstdichtende Septum in den Trägergasstrom eingebracht. Dieser wurde in einem wählbaren Verhältnis mittels Nadelventil so geteilt, dass der kleinere Teil der Probe in die Säule geführt, der andere Teil nach aussen abgeleitet wurde. Das übliche Teilungsverhältnis betrug 1:10 (bei einer dosierten Menge von 1 ul).

3) Stromteilerlose Injektion (82,83)

Diese Art der Injektion wurde ohne die oben genannte Stromteilung und damit

der Ableitung des grössten Teils des Probengemisches durchgeführt. Die Injektion der Probe erfolgte in den Injektor bei einer Temperatur von 250°C, wo sie verdampfte und mit dem Trägergasstrom in die Säule gelangte, deren Temperatur 80°C betrug. Die leicht flüchtigen Komponenten der Probe wie z.B. das Lösungsmittel durchflossen die Säule, während die höher siedenden Anteile der Probe als Pfropf am Säulenanfang kondensierten. Hatte das Lösungsmittel die Säule verlassen, wurde der Ofen schnell aufgeheitzt, der kondensierte Probenanteil so verdampft und analysiert.

4) Ganzglasnadelinjektion (Kapillare) (84)

Es wurde ein Ganzglasnadelinjektor verwendet, der von der Fa. Thoma in Freiburg hergestellt wurde (verändert nach 84).
Das Prinzip des Ganzglasnadelinjektors beruht darauf, dass das Lösungsmittel, das die Proben enthält und alle niedersiedenden Komponenten schon vor dem Eintritt in die Säule von den hochsiedenden Komponenten des Probengemisches abgetrennt werden. Dies wird durch die Teilung des Trägergasstromes (A, Abb. 6) erreicht. Der Glasinjektor hat einen Teilerpunkt für das Trägergas, welcher sich ausserhalb des Injektorblocks des Gaschromatographen befindet. Ein Teil des Gases fliesst durch die Kapillare, der andere wird an der Nadelspitze vorbei über ein Teflonventil ins Freie geleitet. Die Strömung des Gases an der Nadel wird durch dieses Ventil geregelt. Der Trägergasstrom durch die Säule wird über einen Druckregler konstant gehalten und ist von der Einstellung des Teflonventils unabhängig. Man kann grosse Mengen des zu analysierenden Gemisches auf die Nadel dosieren, ohne dass die Gefahr der Überladung der Säule mit Lösungsmittel besteht.
Mit einer Injektionsnadel wurde das Septum (7, Abb. 6) durchstossen und das gewünschte Probenvolumen (z.B. 10 ul) vorsichtig auf die Nadelspitze (4, Abb. 6) gebracht. Nach 5 min. war das Lösungsmittel von der Spitze der Nadel

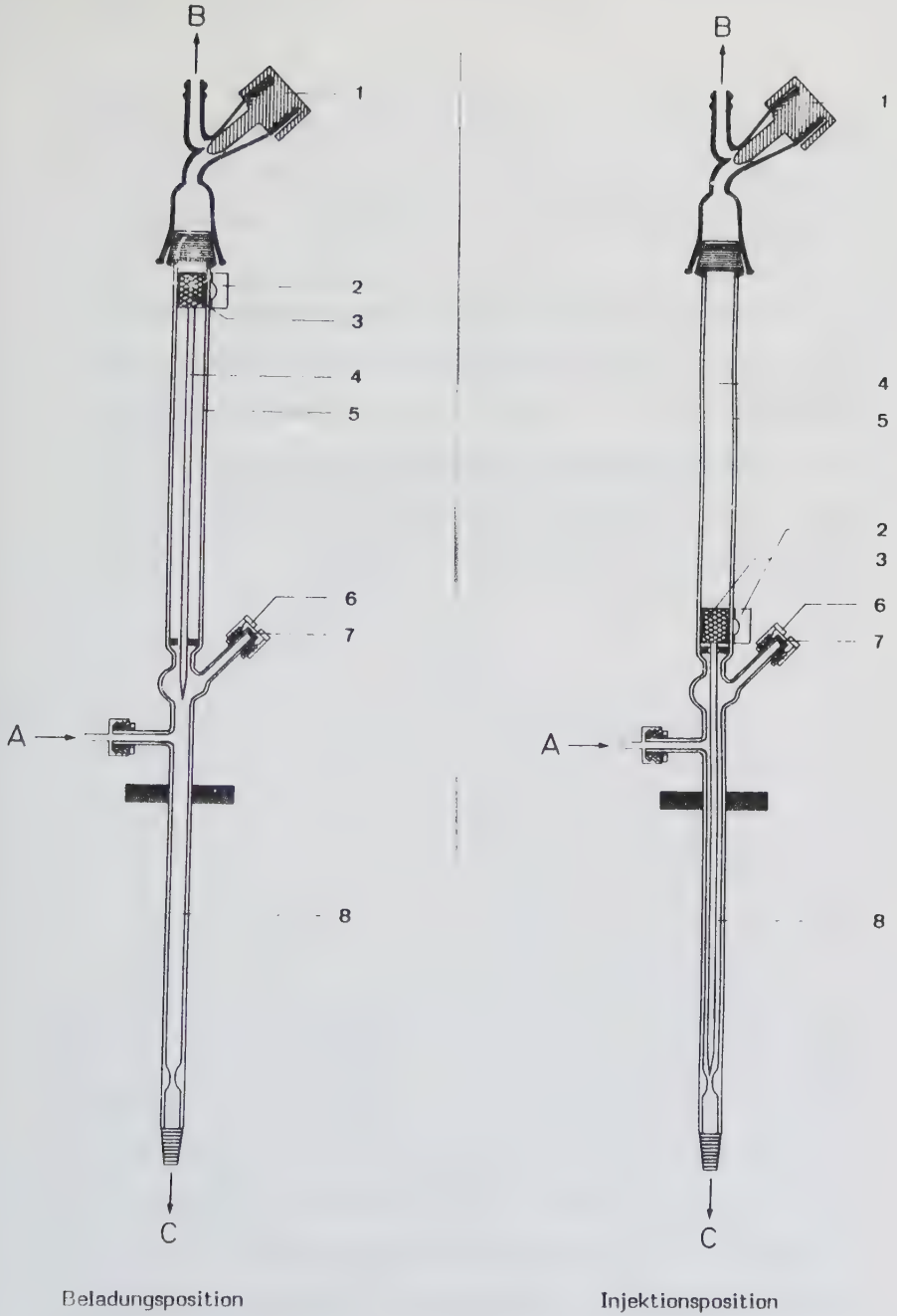


Abb. 6 Glasnadelinjektor für Kapillargaschromatographie (verändert nach eigenen Angaben nach 84)

verdampft, worauf diese mit Hilfe des Magneten (2, Abb. 6) in den Injektorblock (8, Abb. 6) eingeführt wurde. Dort verdampfte der auf der Nadel verbleibende Rückstand und wurde mit dem Trägergas auf die Säule gespült.

Zur Installation des Glasnadelinjektors musste die Injektoreinrichtung des zur Verfügung stehenden Gaschromatographen (Varian 3700) modifiziert werden. Die Trägergaszuleitung wurde abgenommen, um am Glasinjektor angebracht zu werden. Die Spliteinrichtung und die Septumspülung des Gerätes wurden abgenommen und blind geschlossen. Die Septumschraube wurde auf 6 mm aufgebohrt, um dem Glasrohr des Glasnadelinjektors als Halterung und Abdichtung zu dienen.

---

1 = Teflonventil
2 = Magnet
3 = Metallhalterung der Glasnadel
4 = Glasnadel
5 = Glasnadelführung ausserhalb
" innerhalb des Injektorblocks
6 = Septum Halteschraube
7 = Septum
A: Trägergrasstrom, B: nach Aussen, C: zur Kapillare

3.16.4. Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen (85)

Zur Bestimmung der Bedingungen, die eine optimale Trennung der Prostaglandine erlaubten, musste eine Reihe von Parametern optimiert werden.

Der geeignete Temperaturbereich wurde bestimmt, indem ein Gemisch von PGE_2 und PGE_1 (als Methylester, Butyloxim, Trimethylsilyläther) injiziert und mit einem linearen Temperaturanstieg von 5^oC pro Minute chromatographiert wurde.

Die Optimierung der Trägergasgeschwindigkeit wurde isotherm mit demselben Substanzgemisch bei der jeweiligen für die Säule geeigneten Temperatur durchgeführt. Für verschiedene Trägergasgeschwindigkeiten bzw. Säulenvordrücke wurden nach GL.1 die Werte für die Höhe eines theoretischen Bodens berechnet:

GL.1 $n = 5.54 (t_s/b_{0.5})^2$ — n : Anzahl der theoret. Böden; t_s : Retentionszeit; $b_{0.5}$: Halbwertsbreite des Peaks

GL.2 $h = n/L$ — h : Höhe eines theoret. Bodens; L : Länge der Säule

Trägt man h gegen die Trägergasgeschwindigkeit auf, so erhält man eine Kurve, die für h bei einer gewissen Trägergasgeschwindigkeit ein Minimum aufweist. Bei diesem Minimum hat die Säule eine optimale Anzahl theoretischer Böden, sodass hier ihre Trennkraft am grössten ist. Diese Optimierung wurde anhand des zweiten Peaks von PGE_2 durchgeführt. Zum Vergleich von Säulen verschiedener Polarität wurde zu diesem Zweck der gesättigte Kohlenwasserstoff Oktacosan eingesetzt, da dieser mit polaren Gruppen der Phase nicht in Wechselwirkung treten kann, die das Ergebnis der Analyse verfälschen würde. (Diese Interaktionen können bei unpolaren Phasen nicht vorkommen)

3.16.5. Charakterisierung der flüssigen Phasen (86)

Zur Charakterisierung der Säulen auf ihre Eignung zur Analyse von Prostaglandinen wurde die Auflösung des PGE_1/E_2 Gemisches und die Auflösung der syn- und anti-Stereoisomeren des Butyloxims (Methylester, Trimethylsilyläther) von $6kPGF_1$ und TxB_2 herangezogen. Die Auflösung ist definiert als das Verhältnis aus der Retentionsdifferenz zweier getrennter Komponenten und der Summe von deren Peakbreiten in halber Höhe. Sie wird nach folgender Formel bestimmt:

GL.3 : $$R_s = \frac{t''_{m+s} - t'_{m+s}}{b''_{0.5} + b'_{0.5}}$$

t''_{m+s} : Retentionszeit des später eluierten Peaks

t'_{m+s} : Retentionszeit des ersten eluierten Peaks

$b'_{0.5}, b''_{0.5}$: Halbwertsbreiten der beiden Peaks

3.16.6. Identifikation der Prostaglandine (87)

Zur Identifikation der einzelnen Prostaglandine wurden Standardchromatogramme der einzelnen authentischen Proben aufgenommen. Die Identifizierung geschieht durch Berechnung der Retentionsindices nach Kovats. Das System beruht auf der Verwendung der Reihe der homologen n-Paraffine als Standardverbindungen für die Relativierung der Retentionsgrössen. Wegen des linearen Zusammenhanges zwischen dem Logarithmus der Nettoretentionszeit und der Anzahl der C-Atome der Glieder einer homologen Reihe, wird die Retention einer Komponente x zwischen zwei n-Paraffinen mit der Kohlenstoffzahl z und z+1 (von denen eines vor und eines hinter der zu bestimmenden Komponente eluiert wird) logarithmisch interpoliert.

Der Kovatsindex einer Komponente x wird für eine stationäre Phase y bei der Temperatur T nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{GL. 4:}\quad I_T^y = 100 \times z + 100 \frac{\log(t_s)_x - \log(t_s)_z}{\log(t_s)z+1 - \log(t_s)_z}$$

$(t_s)_x$ = Retentionszeit der zu bestimmenden Komponente

$(t_s)_z$ = Retentionszeit des Kohlenwasserstoffes mit z Kohlenstoffen

$(t_s)_{z+1}$ = Retentionszeit des Kohlenwasserstoffes mit z+1 Kohlenstoffen

I_T^y = Kovatsindex für stat. Phase y und isotherme Temperatur T

Pro C-Atom wächst entsprechend der Definition der Retentionsindex um 100 Einheiten. So hat n-Hexan den Kovats-Index 600, Dotriacontan 3200 usw. Ist der Unterschied in der C-Zahl zwischen den beiden zur Interpolation benutzten n-Paraffinen nicht 1 sondern z.B. 4, so muss die Gleichung mit einem entsprechenden Vielfachen von Hundert multipliziert werden. Dies ist dann der Fall, wenn der Bereich zwischen den beiden Eichkohlenwasserstoffen gross sein muss, weil die zu identifizierenden Peaks über einen grossen Elutionsbereich gestreut sind.

Gleichung 4 gilt nur für isotherm durchgeführte Chromatographie. Durch Verunreinigung der Proben an niedersiedenden Substanzen war es oft notwendig, temperaturprogrammiert zu arbeiten. In diesem Falle ist das Verhältnis der Retentionszeiten der Glieder einer homologen Reihe nicht mehr logarithmisch. Es kann in guter Näherung mit folgender Formel gearbeitet werden (85):

$$\text{GL. 5:}\quad I_{Pr}^y = 100 \times z + 400 \frac{(t_s)_x - (t_s)_z}{(t_s)_{z+4} - (t_s)_z}$$

$(t_s)_x$ = Retentionszeit der zu bestimmenden Substanz

$(t_s)_z$ = Retentionszeit des Kohlenwasserstoffes mit z Kohlenstoffen

$(t_s)_{z+4}$ = Retentionszeit des Kohlenwasserstoffes mit z+4 Kohlen-

Als Retentionstandards dienen Oktacosan und Dotriakontan, die bei allen zu analysierenden Proben cochromatographiert werden. Liegt ein zu analysierender Peak nicht in dem Bereich zwischen diesen beiden Eichparaffinen, wie dies z.B. bei $PGF_{2\alpha}$ der Fall ist, wird aus den Retentionszeiten der beiden eingespritzten Paraffine eine Retentionsgerade erstellt und daraus der Wert für ein entsprechendes Paraffin entnommen, das vor $PGF_{2\alpha}$ eluiert. Mit dessen Hilfe kann die Berechnung durchgeführt werden.

3.16.7. Quantitative Bestimmung (GLC)

Zur quantitativen Bestimmung unbekannter Mengen in einer Probe wurde die Methode der Messung über einen inneren Standard verwendet. Zu den zu analysierenden Proben wurde eine genau abgewogene Menge des inneren Standards gegeben. Durch Vergleich der Peakflächen der unbekannten Substanz, die von einem dem Gaschromatograph angeschlossenen Integrator ausgedruckt werden, mit der Fläche des Standardpeaks, die zu einer bekannten Menge Standardsubstanz korreliert, kann man leicht die Menge der zu analysierenden Substanzen bestimmen.

3.17. Radioimmunassay

3.17.1. Antiseren

Spezifische Antiseren gegen PGE_2 und gegen $PGF_{2\alpha}$ wurden von Herrn Dozent Dr. Peskar (Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Eine ausführliche Beschreibung über Spezifität und Herstellung der Seren wird in (88,89,90) gegeben.

Einige Eigenschaften seien im Folgenden genannt.

1) Kreuzreaktionen mit anderen Prostaglandinen im RIA

Diese Eigenschaft wird in der relativen Kreuzreaktion bzw. der ID_{50} (Inhibitory Dose) ausgedrückt. Diese gibt die Menge eines Prostaglandins in Picogramm an, welche benötigt wird, um 50 % des eingesetzten radioaktiven Antigens vom homologen Antikörper zu verdrängen.

Tabelle 2: Relative Kreuzreaktion von PG im anti PGE_2-System

Anti-PGE_2 (89)	kreuzreagierendes PG	ID_{50}	rel. Kreuzreaktion
		(pG)	(%)
	E_2	79,5	100
	E_1	602,6	13,2
	andere wie $F_{2\alpha}$ usw.	> 10000	< 0,8

Tabelle 3: Relative Kreuzreaktion von PG im anti-PGF_2 -System

Anti-$PGF_{2\alpha}$ (9)	kreuzreagierendes PG	ID_{50}	rel. Kreuzreaktion
		(pG)	(%)
	$F_{2\alpha}$	89,3	100
	$F_{1\alpha}$	632,0	13,2
	andere wie E_2 usw.	> 10 000	< 0,9

Die Nachweisgrenze für Prostaglandine lag bei den verwendeten Antiseren bei 15 pg (für PGE_2) bzw. 20 pg (für $PGF_{2\alpha}$).

Die Antiseren wurden in einer Endverdünnung von 1:100 000 (anti PGE_2) und 1:90 000 (anti $PGF_{2\alpha}$) eingesetzt.

3.17.2. Radioaktive Prostaglandine

(^{3}H)-PGE$_2$ und (^{3}H)-PGF$_{2\alpha}$ wurden von der Fa. Amersham und Buchler (Braunschweig) bezogen und hatten eine spezifische Aktivität von: (^{3}H)-PGF$_{2\alpha}$: (120 000 - 170 000 mCi/mM), (^{3}H)-PGE$_2$: (120 000 - 170 000 mCi/mM).

3.17.3. Durchführung des Radioimmunassays (91,92)

Das Verfahren soll anhand der Bestimmung von PGF$_{2\alpha}$ dargestellt werden. Der RIA für PGE$_2$ wurde analog durchgeführt. In Einmal-Kunststoffröhrchen wurden 1,4 ml einer Verdünnung von (^{3}H)-PGF$_{2\alpha}$ (in PBS + 0,1% Gelatine (GPBS), pH 7,4 ca. 12 000 dpm) mit 0,5 ml Makrophagenüberstand und 0,1 ml einer o.a. Antikörperverdünnung in GPBS (anti PGE$_2$: 1:100 000, anti PGF$_{2\alpha}$: 1:90 000) gemischt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 2 ml ergab. Wurden geringere Volumina Zellüberstand eingesetzt, musste mit entsprechenden Mengen des Kulturmediums auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt werden.
Die Proben wurden gut geschüttelt und für mindestens 12 Stunden bei 4^{0}C inkubiert. Die freie Antigenfraktion wurde von der an den Antikörpern gebundenen getrennt, indem die freie Fraktion an Aktivkohle (0,2 ml einer Suspension von 20 mg/ml) absorbiert wurde. Nach Zugabe der Aktivkohle wurde sofort abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 4^{0}C, 2700 Upm). Der Überstand wurde mit 7 ml Szintillationsflüssigkeit (Scintgel Roth) gemischt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard) gemessen. Die Zählausbeute betrug unter diesen Bedingungen 25 %.
Jedem RIA wurde eine Standardkurve mit bekannten Mengen PGF$_{2\alpha}$ in GPBS und Kontrollwerte für die eingesetzte Radioaktivität, für die Bindefähigkeit des Antiserums und Proben ohne Antiserum angefügt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Lipopolysaccharid induzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen

4.1.1. Versuche mit Knochenmarkmakrophagen

Makrophagen, die durch Kultivierung von Knochenmarkzellen *in vitro* gewonnen werden, stellen aufgrund der Homogenität der Zellpopulation ein sehr geeignetes System für die im Rahmen dieser Arbeit beabsichtigten Untersuchungen zur Wirkung von Lipopolysaccharid auf Makrophagen dar.

> In dem von Meerpohl (77) beschriebenen Kultursystem wird, hauptsächlich durch den Einfluss von "conditioned medium" die Differenzierung von Knochenmarkzellen in Richtung Makrophagen gelenkt. Als "Conditioned Medium" bezeichnet man den Überstand einer Fibroblastenlinie (L292), welche spontan einen sogenannten "Colony Stimulating Factor" (CSF) in das Medium abgibt. Nach einer Kulturdauer von 6 Tagen findet man in den Kulturen ausser Makrophagen und deren Vorstufen praktisch keine anderen Zellformen, wie z.B. Granulozyten mehr. Mit solchen Kulturen kann man grosse Quantitäten erhalten und erreicht nach einer Kulturdauer von 7 Tagen eine Verfünffachung der anfänglich eingesäten Zellzahl (77).

In den folgenden Versuchen wurden Makrophagen (2×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen/ml) aus sieben Tage alten Knochenmarkkulturen mit LPS inkubiert. Die Inkubation erfolgte über eine Dauer von 3 bzw. 24 Stunden, der Gehalt an PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ im Zellüberstand wurde mit Hilfe des Radioimmunassay bestimmt.

Bei Inkubation mit LPS (1 ug SmRe-LPS, Abb. 7) wurden die Makrophagen zur Synthese von 1,6 ng $PGF_{2\alpha}$ (Kontrolle ohne LPS: 0,2 ng) und 4,1 ng PGE_2 (Kontrolle 0,7 ng) angeregt. Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden. Reine Knochenmarkkulturen können also durch Inkubation mit reinem Lipopolysaccharid zur Prostaglandinsynthese stimuliert werden.

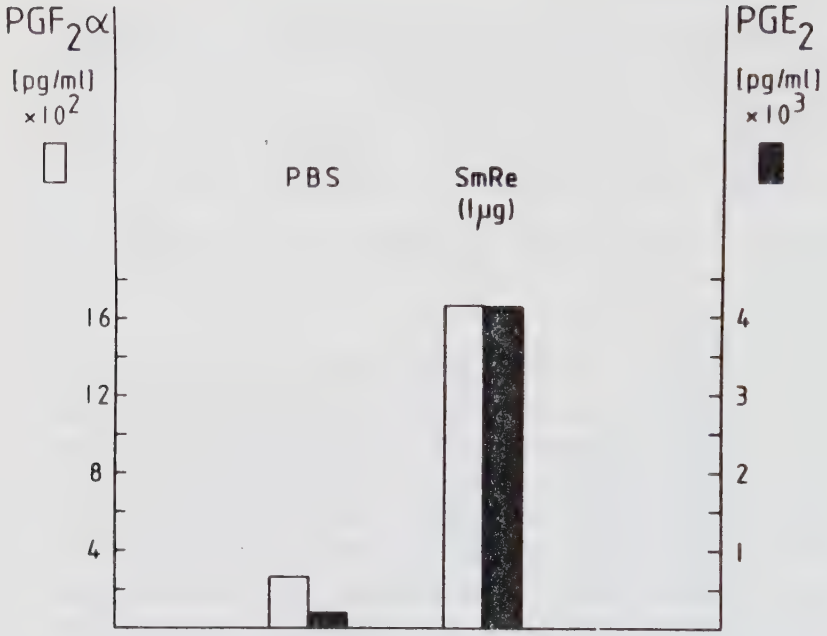


Abb. 7: LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Knochenmarkmakrophagen
(SmRe = LPS der Salmonella minnesota Re-Mutante)

4.1.1.1. Das aktive Prinzip

Um eine Information darüber zu erhalten, welcher Teil des LPS-Moleküls für die Induktion der PG-Synthese verantwortlich ist, wurden Makrophagen mit Lipopolysacchariden verschiedener Mutanten von Salmonella minnesota behandelt. Gemeinsam ist diesen Lipopolysacchariden der Lipidanteil (Lipoid A). Sie unterscheiden sich dagegen in der Länge des Polysaccharidanteils. LPS aus der Re-Mutante besitzt nur einen kleinen Teil des Kerns (KDO-Trisaccharid), während LPS aus Ra-Mutanten das komplette Kern Oligosaccharid

aufweist. Wild-Typ (S-Form) Bakterien synthetisieren ein komplettes LPS mit O-spezifischer Kette, Kern und Lipoid A.

Es wurde darüberhinaus das isolierte, freie Lipoid A getestet, das aus Gründen der Löslichkeit an einen lösungsvermittelnden Träger (bovines Serumalbumin, BSA) komplexiert war.

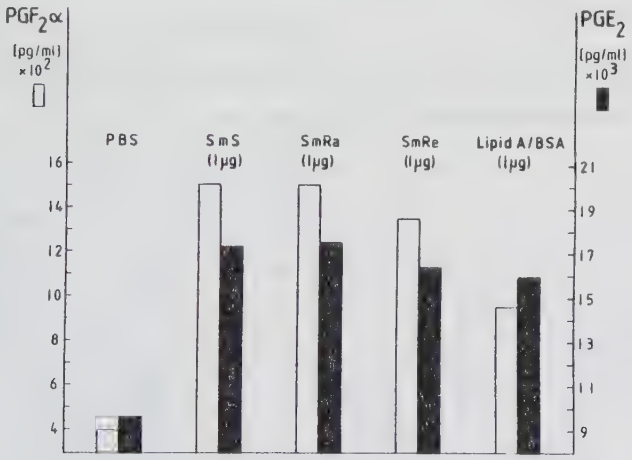


Abb. 8: PG-Synthese von Knochenmarkmakrophagen, induziert mit LPS aus Wildtyp-,Rauhform-Bakterien sowie freiem Lipoid A

Inkubation von Knochenmarkmakrophagen mit den verschiedenen S und R-Form Lipopolysacchariden (1 ug/ml) sowie mit freiem Lipoid A (1 ug/ml) für 24 Stunden ergab bei Kontrollwerten von 0,4 ng für $PGF_{2\alpha}$ und 9,7 ng für PGE_2 bei Stimulation mit SmS für $PGF_{2\alpha}$ 1,5 ng und PGE_2 17,5 ng; mit SmRa-LPS für $PGF_{2\alpha}$ 1,5 ng und PGE_2 18 ng; mit SmRe-LPS 1,3 ng $PGF_{2\alpha}$ und 16,5 ng PGE_2; mit Lipoid A für $PGF_{2\alpha}$ 0,9 ng und PGE_2 16 ng (s. Abb. 8).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Fähigkeit von LPS in Makrophagen eine erhöhte Prostaglandinsynthese zu induzieren durch die Lipoid A Komponente vermittelt wird. Lipoid A repräsentiert also auch in dem beschriebenen System das biologisch aktive Prinzip der Endotoxine.

4.1.1.2. Abhängigkeit der LPS-induzierten PG-Produktion von Inkubationszeit, Zellzahl und LPS-Dosis

Knochenmarkmakrophagen (2×10^5 Zellen) wurden mit LPS (1 ug/ml) über die Dauer von 3 und 24 Stunden bei 37^0C inkubiert (Abb. 9).

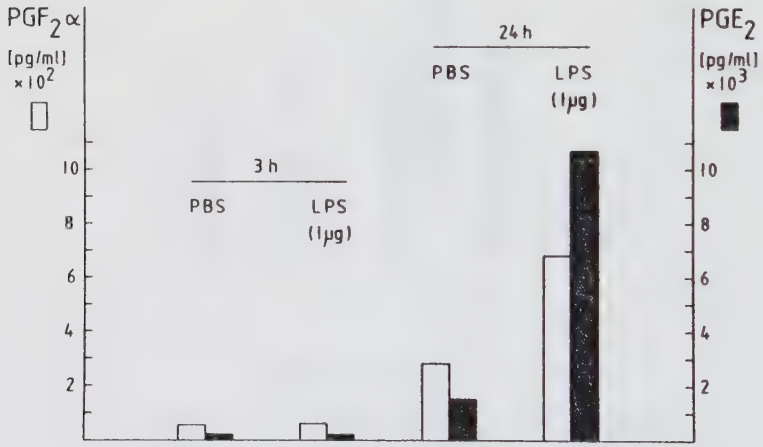


Abb. 9: Zeitabhängigkeit der LPS-induzierten PG-Synthese von Knochenmarkmakrophagen

Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden konnte keine Erhöhung der Synthese von $PGF_{2\alpha}$(0,05 ng) und PGE_2 (0,5 ng) durch LPS-Einwirkung gegenüber den Kontrollen ($PGF_{2\alpha}$: 0,05 ng; PGE_2: 0,5 ng) festgestellt werden. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden jedoch war eine signifikante Stimulation

nachweisbar. Kontrollen zeigten nach dieser Zeit einen Gehalt von 0,3 ng $PGF_{2\alpha}$ und 1,5 ng PGE_2, während diese Werte bei LPS-Behandlung auf 0,7 ng für $PGF_{2\alpha}$ und 10,7 ng für PGE_2 anstiegen.

Um die Abhängigkeit der Prostaglandinbildung von der Zellzahl zu ermitteln, wurden steigende Mengen an Knochenmarkmakrophagen (1-10 x 10^6/ml) mit einer konstanten Menge LPS (S mRe, 1 ug/ml) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und der Prostaglandingehalt im Überstand mit Hilfe des Radioimmunassays bestimmt. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Prostaglandinsynthese stark von der Dichte der eingesäten Kulturen abhängt. Bei einer Dichte von etwa 6 x 10^6 Zellen erreicht sie ein Optimum (Abb. 10).

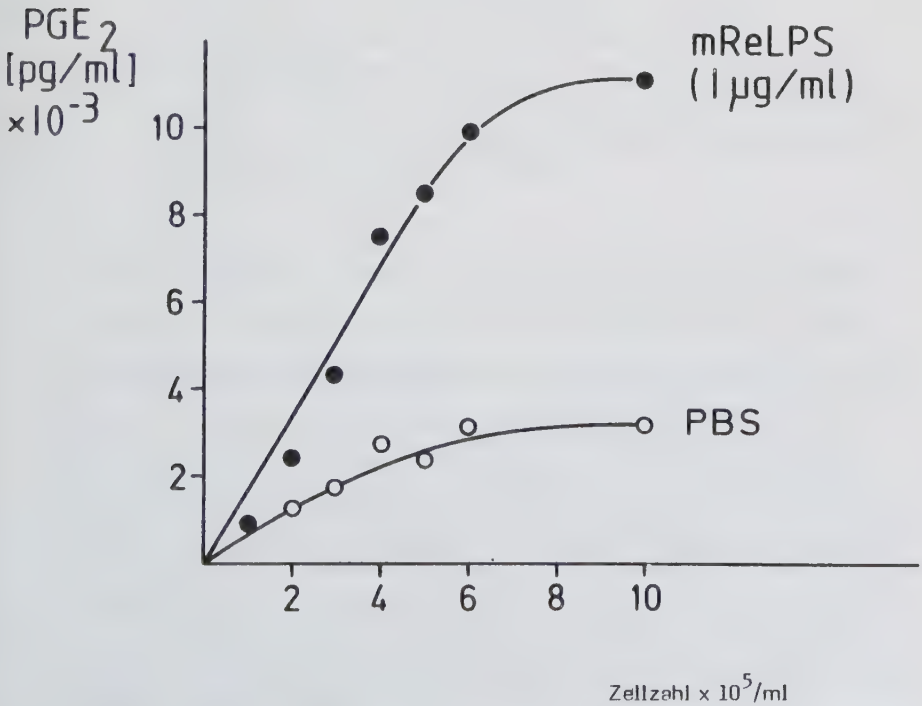


Abb. 10: Abhängigkeit der PG-Synthese von Knochenmarkmakrophagen von

Im folgenden Versuch wurde die Abhängigkeit der Prostaglandinsynthese von Knochenmarkmakrophagen von der Dosis des eingesetzten LPS getestet. Steigende Mengen an SmRe LPS (0,01-100 ug/ml) wurden mit einer Makrophagenkultur von konstanter Zellzahl (2 x 10^5/ml) 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 in den Überständen wurde mit Hilfe des Radioimmunassays bestimmt.

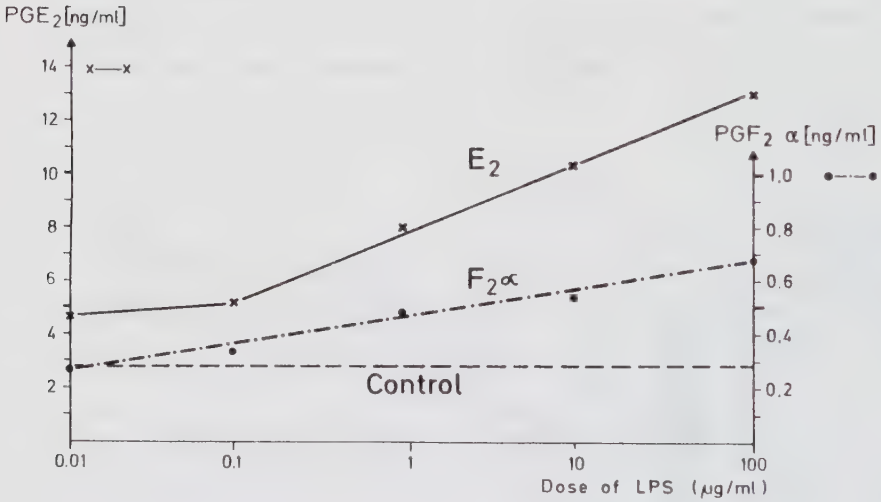


Abb. 11: Abhängigkeit der PG-Synthese von Knochenmarkmakrophagen von der LPS-Dosis

Es zeigte sich (Abb. 11), dass die Prostaglandinproduktion deutlich von der eingesetzten LPS-Menge abhing, bei grösseren LPS-Mengen jedoch keine "Sättigung" in Form einer Abflachung der Kurve auftrat. Eine Erklärung könnte darin bestehen, dass durch hohe Mengen LPS die Makrophagen z.T. lysiert wurden, und die vermehrte PG-Synthese den dadurch verursachten Zelltod anzeigt.

Es wurden daher im folgenden Versuch die toxischen Wirkungen von LPS auf Knochenmarkmakrophagen untersucht.

4.1.1.3. Toxische Wirkungen von Lipopolysaccharid auf Knochenmarkmakrophagen

Absterbende Zellen aus verschiedensten Geweben zeigen eine erhöhte Prostaglandinproduktion (149). Die Ursache dieser Erscheinung ist wahrscheinlich darin zu sehen, dass die Phospholipide durch Desintegration der Zellmembran für die Phospholipase A_2 frei zugänglich sind. Diese setzt daraus Fettsäuren frei, damit steht u.a. Arachidonsäure als Substrat für die Prostaglandinsynthese zur Verfügung.
Es ist bekannt, dass LPS in höheren Dosen zytotoxisch für Zellen (und Makrophagen) ist (93). Es musste daher sichergestellt werden, dass die Dosen, mit denen Makrophagen inkubiert wurden nicht lytisch auf die Zellen wirkte und die Messung der Prostaglandinsynthese lediglich ein Mass für den Zelltod darstellen würde. Zu diesem Zweck wurde die Aufnahme von Trypanblau als Mass für die Toxizität des LPS bestimmt.

Steigende LPS-Dosen (1-1000 ug) wurden zu einer konstanten Anzahl Makrophagen (2×10^5/ml) zugegeben, für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die Intaktheit der Zellen durch ihre Fähigkeit Trypanblau auszuschliessen getestet. Es stellte sich heraus (Abb. 12), dass LPS-Dosen bis zu 10 ug die Makrophagen nicht schädigten. (100 % intakte Zellen), d.h., dass nicht mehr Zellen den Farbstoff aufnahmen als in unbehandelten Kulturen. Ab 50 ug LPS pro Milliliter wird die toxische Wirkung auf die Zellen deutlich: über 10 % der Kulturen wird von Trypanblau angefärbt. Die linear ansteigende Produktion von Prostaglandinen könnte aus diesen Gründen also einer zunehmenden Zellyse zugeschrieben werden.

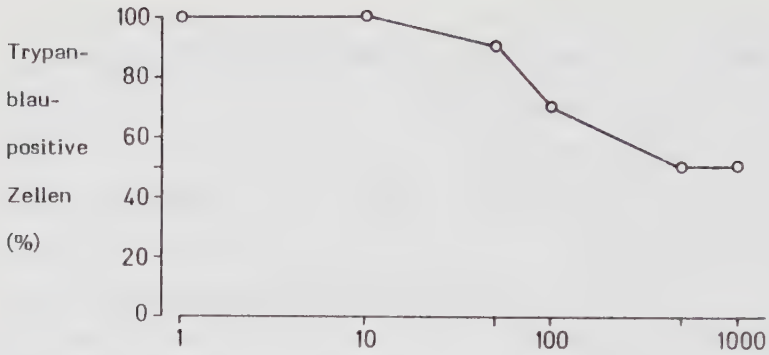


Abb. 12: Aufnahme von Trypanblau LPS-behandelter Knochenmarkmakrophagen.

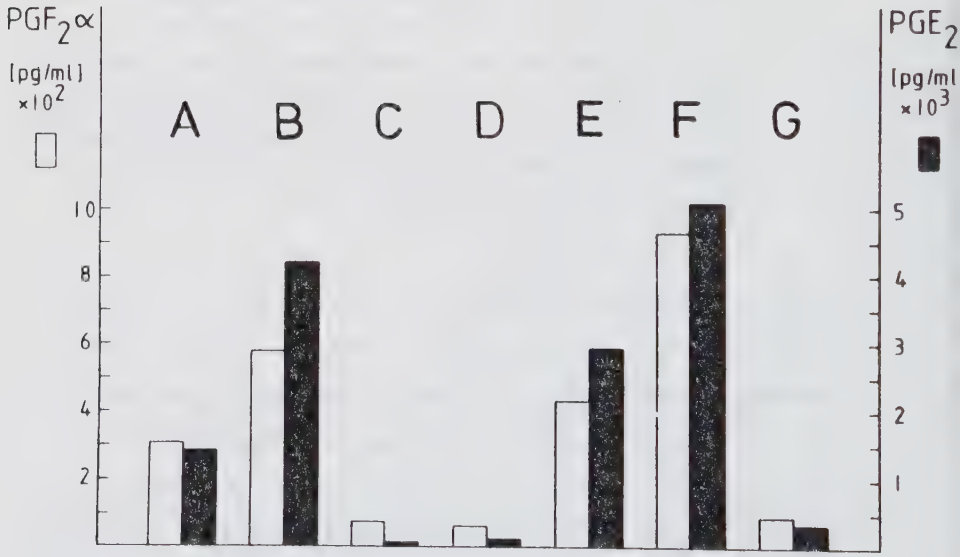


Abb. 13: Effekt von Indomethacin und Arachidonsäure auf die Prostaglandinsynthese von Makrophagen
A = Kontrolle; B = 1 ug LPS; C = 1 ug Indomethacin; D = LPS + Indomethacin; E = 1 ug Arachidonsäure; F = Arachidonsäure + LPS; G = wie F + Indomethacin

4.1.1.4. Einfluss von Indomethacin und Arachidonsäure auf die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Knochenmarkmakrophagen.

Knochenmarkmakrophagen (2 x 10^5/ml) wurden mit LPS (mRe 1 ug) für 24 Stunden bei 37°C in Anwesenheit des Cyclooxygenase-Inhibitors (94) Indomethacin (1 ug/ml) inkubiert. Es zeigte sich in Ansätzen ohne (Abb. 13C) und mit LPS (Abb. 13D), dass die Prostaglandinsynthese gegenüber Kontrollen ohne Indomethacin (Abb. 13 A+B) weitgehend unterdrückt war.
Dieser Befund deutet an, dass LPS eine Neusynthese von Prostaglandinen in Makrophagen induziert.

In diesem Zusammehang sollte erwähnt werden, dass in Überständen von LPS-behandelten Knochenmarkmakrophagen keine Prostaglandinmetabolite (13,14-diHydro-15-Keto-PG's) nachgewiesen werden konnten (Radioimmunassay von Dr. Peskar, Universität Freiburg durchgeführt). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass LPS in Makrophagen eine Neusynthese von PG's bewirkt und nicht etwa PG-metabolisierende Enzyme von Makrophagen hemmt.

Durch Zugabe von Arachidonsäure (1 ug/ml) wurde die spontane (Abb. 13E) und die LPS-induzierte (Abb. 13F) Prostaglandinsynthese gesteigert. Dies deutet auf eine wichtige regulatorische Funktion des Enzyms Phospholipase A_2 in diesem Prozess hin. Die Umgehung dieses Enzyms durch Zugabe von freier Arachidonsäure steigerte die Synthese von PGE_2 um etwa 100 %. Die durch Arachidonsäure gesteigerte Prostaglandinsynthese wurde erwartungsgemäss durch Zugabe von Indomethacin vollständig unterdrückt (Abb. 13G).

4.1.2. Versuche mit Peritonealmakrophagen

Als Quelle für Makrophagen dient in zahlreichen Studien der Peritonealraum verschiedener Tiere. Peritonealzellen lassen sich in guter Ausbeute durch Ausspülen der Bauchhöhle mit einem geeigneten Medium gewinnen (95,96).

Beispielsweise können aus einer NMRI-Maus, die ca. 7 Wochen alt ist, etwa 3-4 x 10^6 Zellen ausgewaschen werden. Die solcher Art gewonnenen Zellpopulationen können in vitro kultiviert werden. Sie bestehen aus verschiedenen Zelltypen wie Granulozyten, Lymphozyten und hauptsächlich reifen Makrophagen (97). Relativ reine Makrophagenkulturen lassen sich aus Peritonealexsudaten dadurch gewinnen, dass man die Zellen über einen Zeitraum von ca. 3 Stunden im Ausspülmedium stehen lässt, wobei die Makrophagen an die Plastikoberfläche des Kulturgefässes adhärieren. Durch Abdekantieren und zwei bis dreifaches Spülen mit Kulturmedium oder PBS können die nicht anhaftenden Zellen wie Granulozyten u.a. aus der Kultur entfernt werden.

Eine Überprüfung solcher Kulturen auf ihre Homogenität wurde durchgeführt, indem die Kulturen wie unter (3.11.2.) beschrieben nach Giemsa angefärbt wurden. Dieses Verfahren ergab einen Anteil von mononuclearen Zellen von 95-98 % in den gewaschenen Kulturen.

Vielfach wird die Zahl der Zellen durch entzündungserregende Agenzien wie z.B. Thioglycollat im Peritonealraum erhöht. Diese Agenzien bewirken eine erhöhte Ausschüttung von jungen Makrophagen in die Peritonealhöhle. Die "induzierte" Zellpopulation ist mit Makrophagenvorstufen, insbesondere Promonozyten angereichert, die sich jedoch von normalen Makrophagen in einer Reihe funktioneller Parameter unterscheiden (z.B. Tumorcytotoxizität (98)).

In den folgenden Untersuchungen wurden deshalb ausschliesslich nicht induzierte Peritonealmakrophagen aus unbehandelten Mäusen verwendet.

4.1.2.1. LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen (1 x 10^6) wurden im Ausspülmedium bei 37°C für 8 Stunden belassen. Das Medium wurde dekantiert, in einer Hettich Tischzentrifuge 10 min. bei 3000 Upm zentrifugiert und sein Gehalt an PGE_2 im

Radioimmunassay bestimmt (Abb. 14). In diesen Überständen wurde ein Gehalt von 3,2 ng PGE_2 gefunden. Nachdem die Zellen 3 mal gewaschen waren, wurden sie für 24 Stunden in Eagles Medium bei 37°C inkubiert und nach dieser Zeit erneut der Überstand abgenommen und dessen Gehalt an PGE_2 bestimmt, welcher 0,5 ng PGE_2 pro ml betrug (Abb. 14). Die Zellen wurden nunmehr mit 10 ug LPS (mRe ED TEA) pro ml für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollen ohne LPS enthielten 1,3 ng PGE_2 pro ml, die mit LPS behandelten Zellkulturen wiesen in ihren Überständen 6,5 ng PGE_2 pro ml auf (Bestimmung mit Hilfe des Radioimmunassays, Abb. 14).

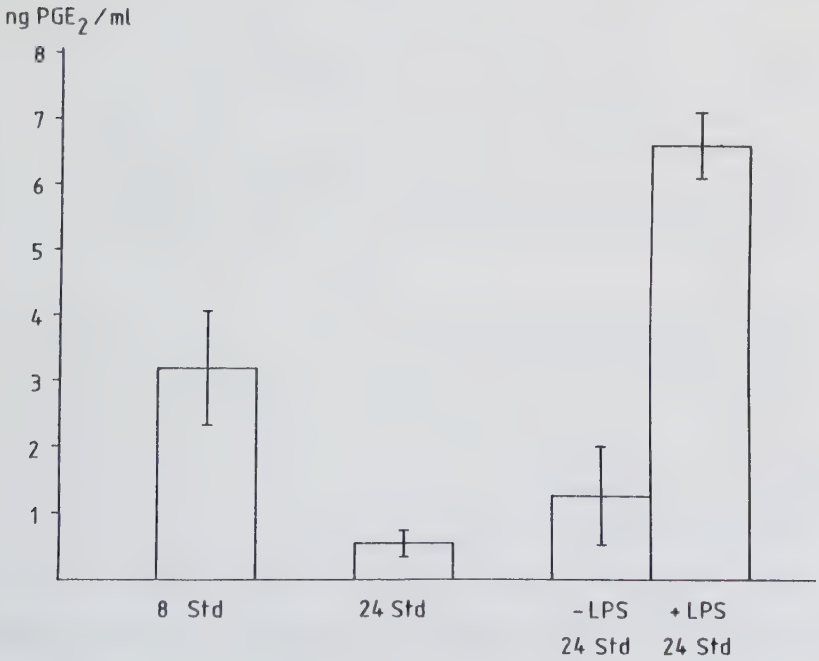


Abb. 14: PGE_2-Synthese während der Präparation (8 Std., 24 Std.) von Peritonealmakrophagen und nach Inkubation mit LPS (mRe ED TEA)

Wie dieses Ergebnis zeigt, können Kulturen, die aus Peritonealmakrophagen von NMRI-Mäusen bestehen, in der gleichen Weise wie Knochenmarkmakrophagen durch LPS zu einer erhöhten Prostaglandinsynthese aktiviert werden.

4.1.2.2. Abhängigkeit der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese von der Inkubationsdauer

Makrophagen (1 x 10^6 Zellen) wurden mit (10 ug/ml, mRe ED TEA) bzw. ohne LPS unterschiedlich lange inkubiert (3,6,12 .... 96 Std.), und der Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 mit Hilfe des Radioimmunassays bestimmt.

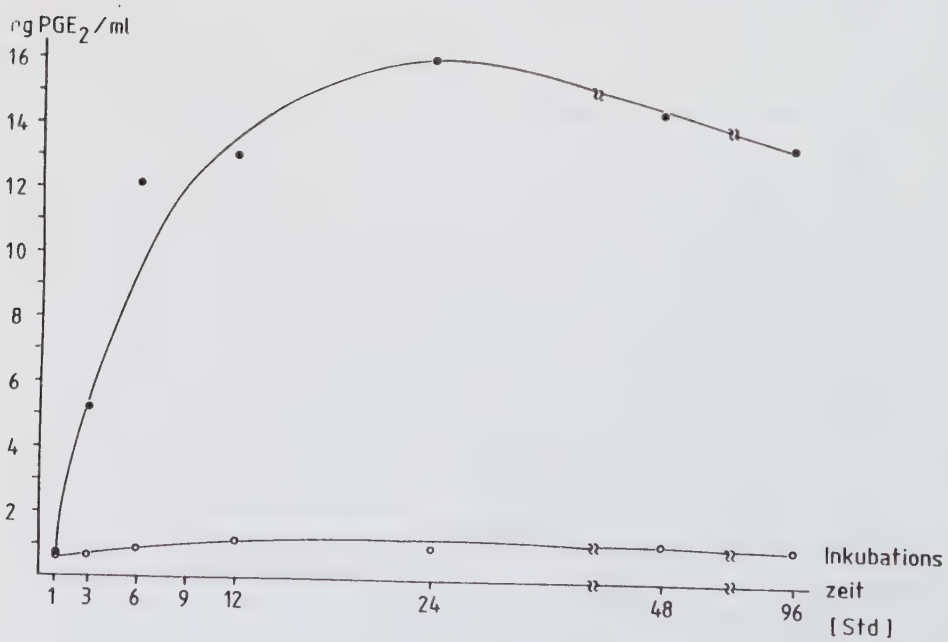


Abb. 15: Abhängigkeit der LPS-induzierten PG-Synthese von Peritonealmakrophagen von der Inkubationsdauer

Die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Peritonealmakrophagen zeigt einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie jene von Knochenmarkmakrophagen mit einem Optimum nach ca. 24 Stunden (Abb. 15).

Für die Synthese von $PGF_{2\alpha}$ ergab sich dieselbe zeitliche Abhängigkeit.

4.1.2.3. Abhängigkeit der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese von der Zellzahl

Die Zellzahl ist aus methodischen Gründen mit einer relativ hohen Schwankung behaftet. Nachdem die Zellen und ihre Anzahl (pro ml) bestimmt worden war, wurde den in der Population vorhandenen Makrophagen 2-3 Stunden Zeit gelassen um zu adhärieren und andere Zelltypen wurden abgewaschen. Es wurde somit immer die Gesamtpopulation mit konstanter Zellzahl eingesät, deren Zusammensetzung abhängig vom individuellen Zustand des Tieres (Infektionen, Alter etc.) allerdings schwanken kann. Diese Schwankung wurde in Kauf genommen, um keine Verluste an adhärierenden Makrophagen durch Manipulationen mit den Kulturen zu haben. Die Schwankungen wurden dadurch weitgehend ausgeglichen, dass stets ein Pool von Zellen aus 5 Mäusen verwendet wurde.

Makrophagen (1×10^5 - $5{,}4 \times 10^6$ pro ml) wurden mit einer konstanten Menge LPS (10 ug/ml) für 24 Stunden bei 37^oC inkubiert. Der Gehalt an PGE_2 in den Überständen wurde im Radioimmunassay bestimmt.

Wie Abbildung 16 zeigt, ist die PG-Synthese die durch LPS in Peritonealmakrophagen ausgelöst wurde von der Anzahl der eingesetzten Zellen im Bereich zwischen $1\text{-}3 \times 10^5$ Zellen nahezu linear abhängig und erreicht zwischen 8×10^5 und 1×10^6 Zellen ein Optimum. Die spontane Produktion von PG ist bis zu einer Zellzahl von 1×10^6 gleichbleibend ca. 2 ng/ml. Bei einer hohen Anzahl eingesetzter Zellen konnte eine Selbststimulation der Makrophagen (bei 4×10^6 Zellen: 11,5 ng PGE_2) festgestellt werden, die durch LPS-Zugabe nur noch geringfügig stimuliert werden konnte (13 ng/ml)

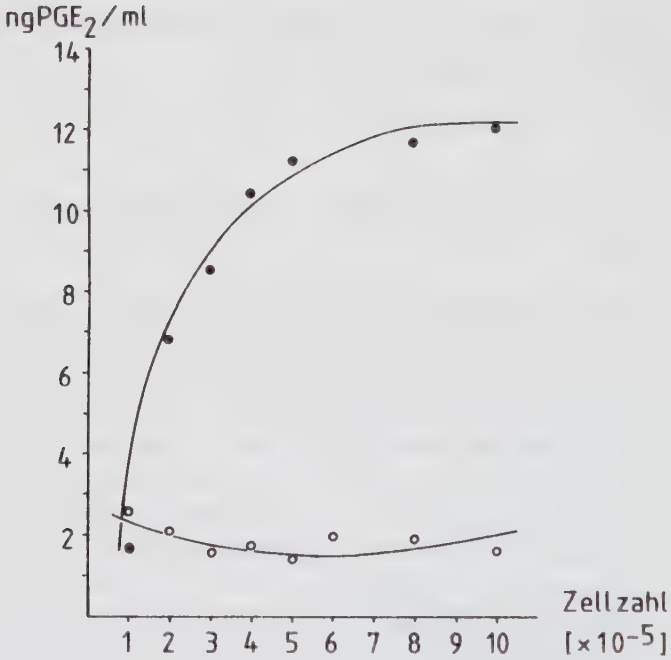


Abb. 16: Abhängigkeit der LPS-induzierten PG-Synthese von der Anzahl der eingesetzten Zellen

(nicht in Abb. 16 gezeigt). Wie dieser Versuch zeigte, verhalten sich Peritonealmakrophagen auch bezüglich der Abhängigkeit der PG-Synthese von der Zellzahl ähnlich wie Knochenmarkmakrophagen.

4.1.2.4. Abhängigkeit der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese von der LPS-Dosis

Eine konstante Anzahl von Makrophagen (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden mit steigenden Dosen LPS (1-200 ug/ml) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Gehalt an PGE_2 in den Überständen wurde danach im Radioimmunassay

bestimmt.

Es stellte sich heraus (Abb. 17), dass die Synthese von PGE_2 bis zu einer Dosis von 100 ug anstieg. Mit höheren Dosen wurde eine Sättigung erreicht, was sich in der Dosis-Wirkungskurve in einem Plateau zeigt (Abb. 17). In dieser Hinsicht verhalten sich Peritonealmakrophagen anders als die getesteten Knochenmarkmakrophagen (s.: 4.1.1.2.), die kein solches Plateau in ihrer Dosis-Wirkungskurve zeigen.

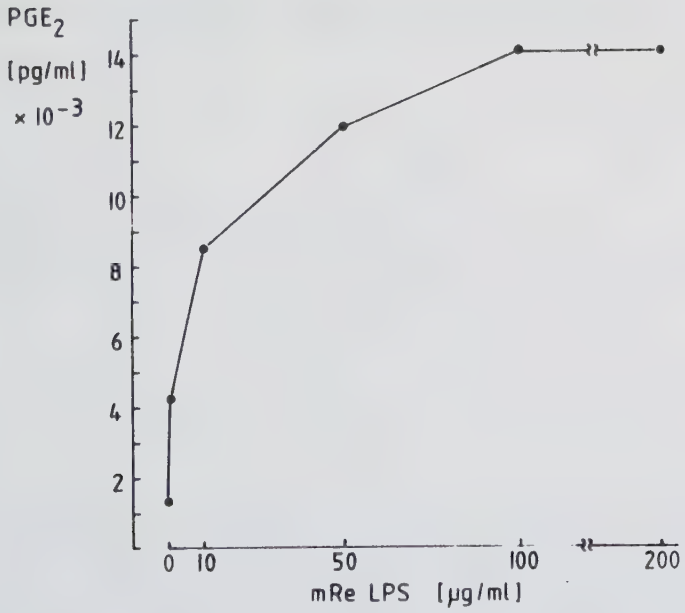


Abb. 17: LPS-Dosis-Wirkungsabhängigkeit der PG-Synthese von Peritonealmakrophagen.

4.1.2.5. Die Abhängigkeit der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese von Peritonealmakrophagen vom Alter der Mäuse

In den vorher beschriebenen Experimenten waren Mäuse verwendet worden, die zwischen 6 und 8 Wochen alt waren. Um den Einfluss des Alters der Mäuse auf die Prostaglandinsynthese und deren Stimulierbarkeit zu testen, wurden aus NMRI-Mäusen, welche 16-18 Wochen alt waren, Peritonealmakrophagen präpariert und mit LPS nach dem üblichen Verfahren stimuliert.

Tabelle 4: Einfluss des Alters der Mäuse auf die Stimulierbarkeit der Prostaglandinsynthese der Peritonealmakrophagen durch LPS

Alter der Mäuse	Prostaglandin E_2 Bildung		Relative Stimulation
	- LPS	+ LPS	
Wochen	(ng/ml ± SA)(1)		%
7	3,5 ± 0,4	15,3 ± 2,3	337
17	50,3 ± 5,2	70,4 ± 6,4	40

(1) n = 4

Es wurde gefunden (Tab. 4), dass Makrophagen aus alten Mäusen schon spontan erheblich grössere Mengen PGE_2 als solche aus jüngeren Mäusen produzieren. Makrophagen aus älteren Tieren sind jedoch in wesentlich geringerem Masse mit LPS zur Synthese von PGE_2 stimulierbar. Diese Erscheinung ist möglicherweise auf eine unspezifische Aktivierung der Makrophagen (wie sie durch wiederholte Infektionen bei älteren Mäusen hervorgerufen werden kann zurückzuführen).

4.1.2.6. Abhängigkeit der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese in Makrophagen vom Mäusestamm

Sultzer konnte 1968 zeigen (99,100), dass der Inzucht-Mäusestamm C3H/HeJ gegenüber den letalen Wirkungen von LPS refraktär ist. Darüberhinaus wurde gefunden, dass LPS in diesen Mäusen keine Adjuvanswirkung entwickelt und nur schwach immunogen wirkt (101,102). Es wurde vermutet, dass die Unfähigkeit der C3H/HeJ Maus, auf LPS-Reize zu antworten darin ihre Erklärung findet, dass B-Lymphozyten nicht zur Proliferation stimuliert werden (103,104). Von Glode et al. wurden Versuche veröffentlicht (105), die zeigen, dass auch Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen einen Defekt gegenüber LPS-Wirkungen (LPS-induzierte Cytotoxizität) aufweisen.

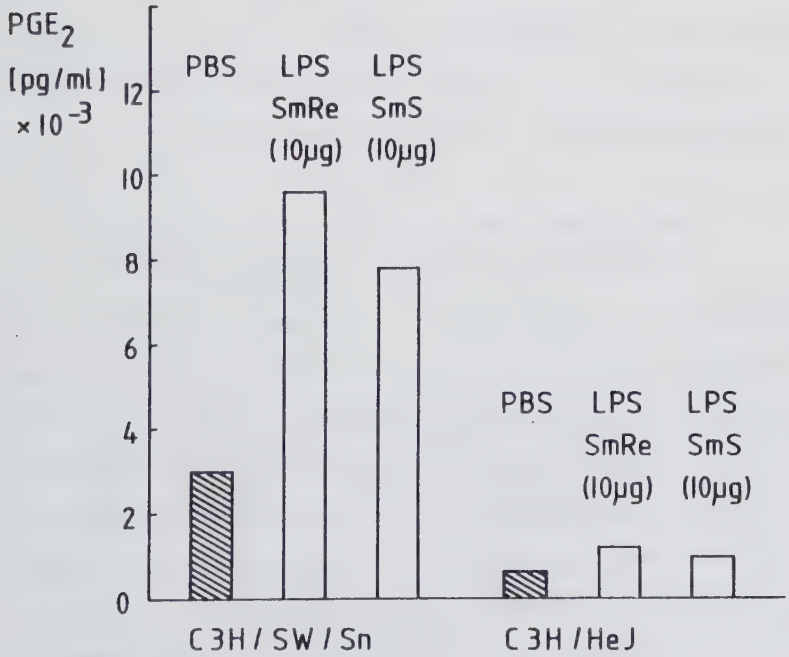


Abb. 18: Induktion der PG-Synthese durch LPS in Makrophagen aus C3H/HeJ und C3H/HeSwSn Mäusen

Es war deshalb im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, Makrophagen aus C3H/HeJ Mäusen auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, Prostaglandin nach LPS Inkubation zu bilden.

Peritonealmakrophagen (1 x 10^6 Zellen/ml) aus C3H/HeJ Mäusen sowie Zellen aus einem LPS empfindlichen Stamm (C3H/HeSwSn) wurden mit LPS (mRe ED TEA 10 ug/ml) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und der Gehalt an PGE_2 in den Überständen mit Hilfe des Radioimmunassays bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Makrophagen aus C3H/SwSn Mäusen wie erwartet durch LPS zur PG-Synthese angeregt werden konnten (Kontrollen ohne LPS: 1,2 ng/ml, mit LPS: 9,3 ng/ml) (Abb. 18).

Makrophagen aus C3H/HeJ Mäusen hingegen waren zu einer solchen Stimulation nicht in der Lage (Kontrollen ohne LPS: 0,8 ng/ml mit LPS: 2,5 ng/ml). Es wurde daraus der Schluss gezogen, dass der Defekt der C3H/HeJ Maus, ihre Unfähigkeit auf LPS zu reagieren, sich auch auf der zellulären Ebene der Prostaglandinsynthese ihrer Peritonealmakrophagen manifestiert.

4.1.2.7. Prostaglandininduzierende Wirkungen von chemisch modifizierten Lipopolysacchariden, freiem Lipoid A und bakteriellen Proteinen

In den folgenden Experimenten wurden vergleichsweise Endotoxine aus Wildtyp-Bakterien, Rauhmutante (Re), chemisch modifizierte Lipopolysaccharide, sowie freies Lipoid A auf ihre Fähigkeit getestet, die Prostaglandinsynthese in Peritonealmakrophagen zu induzieren. Diese Präparate waren früher (106) in anderen Endotoxin-Tests analysiert worden und ihre biologische Aktivität (wie Pyrogenität, Letalität, B-Zell Mitogenität) war bekannt. Die Versuchsreihe wurde durchgeführt mit dem Ziel festzustellen, ob die endotoxischen Eigenschaften der Präparate möglicherweise mit ihrer Qualität korrelierte, die Prostaglandinsynthese in Makrophagen zu induzieren. Die chemischen und biologischen Eigenschaften der getesteten Präparate sind in Tabelle 5 zu-

Tabelle 5: Verschiedene Lipopolysaccharide, bekannte biologische Wirkungen und die Induzierbarkeit der PG-Synthese in Peritonealmakrophagen

Präparat	Chemische Eigenschaften	Biologische Aktivität Pyrogenität	Letalität	B-Zell-Mitogenität	Induktion der PGE_2-Synthese[1] gegenüber Kontrolle (%)
1. S-LPS (106)	Komplettes Wild-Typ LPS (aus S.minnesota)	+	+	+	692
2. Re-LPS[2] (106)	R-LPS aus der Re-Mutante S.minnesota R595 besteht aus Lipoid A und einem KDO-Trisaccharid	+	+	+	654
3. Re-LPS (OH/NH_2) (Galanos, Rietschel, pers.)	wie 2, Lipoid A-Fettsäuren abgespalten	-	-	-	31
4. Re-LPS (Phtal) (68)	wie 2, freie OH und NH_2-Gruppen mit Phtalsäure acyliert	-	-	-	38
5. S-LPS-OH	wie 1, ester-gebundene Fettsäure abgespalten	-	-	(+)	166
6. Lipoid A/BSA	Freies Lipoid A an BSA komplexiert	+	+	+	691
7. Lipoid A-TEN	Träthylaminsalzform von freiem Lipoid A	+	+	+	1100
8. Lipoid A-OH	Freies Lipoid A, estergeb. Fettsäuren abgespalten	-	-	-	316

1 10 ug LPS/10^6 mØ/ml

2 Tritähylamin-Salz

sammengestellt.

Makrophagen (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden in der üblichen Weise mit jeweils 10 ug der zu testenden Substanz für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Gehalt an PGE_2 in den Überständen wurde danach im Radioimmunassay bestimmt.

Es wurde gefunden (Tab. 5), dass alle Präparate, die in klassischen Endotoxin-Tests wie Pyrogenität, Lethalität oder B-Zell-Mitogenität aktiv waren, auch Makrophagen zur Prostaglandinsynthese anregten. Hingegen waren alle Präparate, die chemisch detoxifiziert waren, auch im Makrophagen-Prostaglandin-System unwirksam.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Prostaglandinsynthese, die durch LPS in Makrophagen angeregt wird, als typische Endotoxinwirkung gewertet werden kann. Darüber hinaus zeigen auch diese Versuche, dass Lipoid A das aktive Prinzip dieser endotoxischen Wirkung darstellt.

Tabelle 6 PG-induzierende Wirkung bakterieller Proteine in Peritonealmakrophagen

Protein	Herkunft	PG-Induktion gegenüber Kontrolle (%)
1. Brauns-Lipoprotein (FLP-SW 2)	E.coli Dr. W. Bessler (Tübingen)	1516
2. Lipid A-associated Protein (LAP II)	E.coli Dr. D. Morrison (Ja Jolla, USA)	860
3. Endotoxin-Protein (EP)	E.coli 0127:B8 Dr. B. Sultzer (New York, USA)	866

In neuerer Zeit wurde von Melchers (107), Sultzer (108) und Morrison (109) gefunden, dass auch bakterielle Proteine, die nicht mit LPS verunreinigt sind, typische Endotoxin-Wirkungen wie z.B. B-Zell-Mitogenität auslösen können. Drei solcher Präparate standen zur Verfügung und konnten auf ihre Prostaglandin-induzierenden Wirkungen in Peritonealmakrophagen untersucht werden.

Sie wurden auf die gleiche Weise wie die Lipopolysaccharide mit den Makrophagen inkubiert.

Es wurde gefunden, dass alle drei getesteten Proteine (LAP II, EP, und FLP-SW 2) starke Induktoren der Prostaglandinsynthese waren. In allen Fällen fand sich eine Stimulation, die grösser als 800 % gegenüber der Kontrolle war (Tab. 6).

4.1.2.8. Inkubation von Makrophagen mit Fettsäuren

Um Informationen über die Spezifität und den Mechanismus der LPS-Wirkung auf Makrophagen (gemessen an der Induktion der PG-Synthese) zu erhalten, wurden Versuche durchgeführt, bei denen als Stimulus Fettsäuren eingesetzt wurde.

Insbesondere durch die Zugabe externer Arachidonsäure sollte untersucht werden, ob Lipopolysaccharide die Prostaglandinsynthese direkt beeinflussen oder ob sie diese über die Aktivierung einer Phospholipase induzieren (d.h. Bereitstellung der biosynthetischen Vorstufen, z.B. Arachidonsäure).

Peritonealmakrophagen (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit Arachidonsäure (0,1; 1; 10 ug/ml) bzw. LPS (10 ug mRe ED TEA), (3-OH-C14, C15, C18:1 ug/ml) für 24 Stunden bei 37^0C inkubiert und der Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ nach dieser Zeit im Radioimmunassay bestimmt. Als Kontrolle für die eventuelle Kreuzreaktion des Antikörpers mit Arachidonsäure im Radioimmunassay wurde eine Probe mitgeführt, die 10 ug Arachidonsäure enthielt, jedoch keine Makro-

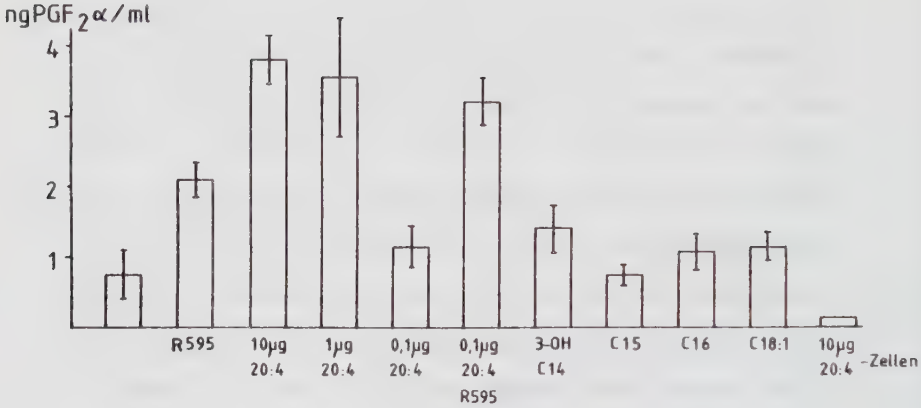


Abb. 19: PG-Synthese von Peritonealmakrophagen mit verschiedenen Fettsäuren. R 595: LPS, 3-OH C14: 3-Hydroxymyristinsäure: C15: Pentadecansäure; C16: Palmitinsäure; C18:1: Ölsäure; 20:4: Arachidonsäure

phagen. Es zeigte sich, dass der Antikörper selbst mit 10 ug Arachidonsäure nicht interferierte (Abb. 19).

Wie weiter aus dieser Abbildung hervorgeht, kann die Prostaglandinsynthese von Peritonealmakrophagen durch Zugabe von Arachidonsäure ohne LPS um das Fünffache gesteigert werden (Kontrolle 0,8 ug $F_{2\alpha}$, 10 ug 20:4 : 3,8 ug). Dieser Effekt ist spezifisch für Arachidonsäure, da er mit verschiedenen anderen Fettsäuren (3-Hydroxymyristinsäure, Pentadecansäure, Palmitinsäure), nicht erzielt werden konnte (Abb. 19). Mit einer Konzentration von 10

ug/ml Arachidonsäure befindet man sich im Sättigungsbereich der PG-Synthese bzw. der PGG_2-Reduktase, da die Zugabe von 1 ug Arachidonsäure praktisch zur gleichen Erhöhung von $PGF_{2\alpha}$ führt. Eine Sättigung der Prostaglandinsynthetase wird offensichtlich zwischen 0,1 ug und 1 ug pro ml Arachidonsäure erreicht, da diese Menge immer noch eine Stimulation nach sich zieht (Arachidonsäure 0,1 ug + LPS: 3,1 ug $PGF_{2\alpha}$; LPS: 2,1 ug $PGF_{2\alpha}$). Mit der Zugabe von Arachidonsäure wurde das Substrat für die Prostaglandinsynthese ($PGF_{2\alpha}$) direkt zur Verfügung gestellt und damit das Enzym Phospholipase A_2 umgangen. Die Prostaglandinsynthetase benötigt allem Anschein nach keine besondere Stimulation, denn sobald die Vorstufe zur Verfügung steht katalysiert sie die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandin. Da dies bei den anderen Fettsäuren, die keine Vorstufen sind, nicht der Fall ist, scheint eine unspezifische Aktivierung unwahrscheinlich. Der Schluss liegt nahe, dass die Induktion der Prostaglandinsynthese durch LPS zur Voraussetzung eine Aktivierung der Phospholipase A_2 hat. Der Wirkung des LPS läge demnach ein Mechanismus zugrunde, der die Stimulation dieses Enzyms einschliesst.

Die durch die Prostaglandinsynthese gemessene LPS-Wirkung auf Makrophagen würde demnach darin bestehen, die Phospholipase A_2 zu aktivieren.

Es ist bekannt, dass der Prozess der Phagozytose bei Makrophagen eine Aktivierung der PLA_2 einschliesst, dies kann unter anderem in einer erhöhten Synthese von Prostaglandinen gemessen werden (16). Sollte LPS seine Wirkung auf Makrophagen dadurch entfalten, dass es von diesen phagozytiert wird, so müsste sich dieser Vorgang unter anderem in einer gleichartigen Synthese von Prostaglandinen zeigen, was sich z.B. in einer ähnlichen Zeitkinetik zeigen müsste.

4.1.2.9. Induktion der Prostaglandinsynthese in Peritonealmakrophagen mit Zymosan.

Peritonealmakrophagen (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden mit Zymosan (500 ug) für eine Stunde bei 37^oC inkubiert. Danach wurden die Zellen bzw. Zymosanpartikel abzentrifugiert und in den Überständen der Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ mit Hilfe des Radioimmunassays bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte: 1,7 ng/ml $PGF_{2\alpha}$(mit Zymosan) 0,3 ng/ml $PGF_{2\alpha}$(ohne Zymosan). Diese Werte entsprechen in etwa denen, die mit LPS nach 24 Stunden erzielt wurden (1,8 ng mit LPS; 0,4 ng ohne LPS), nach einer Stunde konnte mit LPS als Stimulus keine Erhöhung der Prostaglandinsynthese festgestellt werden.

4.2. Vergleich der Wirkungen von Lipopolysaccharid und Zymosan auf die Aktivität des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase und des cytoplasmatischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase.

Die Sekretion lysosomaler Enzyme aus Phagozyten ist eng mit der Endozytose von Partikeln verknüpft (96, 110, 111).

Um einen weiteren Hinweis auf den Mechanismus der Interaktion zwischen LPS und Makrophagen (Phagozytose ?) zu erlangen, wurden Experimente durchgeführt, welche die Stimulation der Sekretion des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase (NAcGlcNase) durch Zymosan bzw. LPS untersuchen.

Makrophagen (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden für 24 Stunden mit LPS (10 ug/ml) und ohne LPS bei 37^oC inkubiert. Nach dieser Zeit wurde in den mit LPS behandelten Proben und entsprechenden Kontrollen Bestimmungen für LDH und NAcGlcNase durchgeführt, während die restlichen Proben für 1 Stunde mit Zymosan (500 ug/ml) bei 37^oC inkubiert wurden.

Danach wurden die Enzymbestimmungen in den Überständen dieser Inkubationen vorgenommen.

Tabelle 7: Vergleich der spez. Aktivitäten von LDH und NAcGlcNase in Überständen Zymosan- und LPS stimulierter Makrophagen

Inkubationsansatz	Spezifische Aktivität im Überstand	
	NAcGlcNase	LDH
	(1)	U/l
Makrophagen	2,4 ± 1,3 (2)	92 ± 22
Makrophagen + LPS	2,3 ± 0,6	96 ± 8
Makrophagen + Zymosan	8,1 ± 2,3	89 ± 4

(1) Einheit der NAc GlcNase: $\frac{\text{uMol Nitrophenol}}{\text{ml x min x Mio Zellen}}$

(2) n = 7

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wurde durch LPS in den Makrophagen keine Sekretion der Glucosaminidase induziert, während die Phagozytose mit dieser Aktivität verbunden ist. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass LPS nicht phagozytiert wird, bzw. nicht die Exozytose von sekundären Lysosomen stimuliert.

4.3. LPS-Stimulation anderer Zellen des Retikuloendothelialen Systems

1) Milzzellen

Werden Milzzellen oder Thymuszellen mit verschiedenen Mitogenen oder Antigenen wie Staphylococcen Enterotoxin B, Phythaemagglutinin P oder Concanavalin A inkubiert, synthetisieren sie erhöhte Mengen Prostaglandin (112). Bei Thymuszellen war es sogar möglich, zwischen reifen und unreifen Zellen Unterschiede in der Fähigkeit zur Prostaglandinsynthese festzustellen (113). Von polymorphkernigen Leukozyten ist bekannt, dass sie bei der Phago-

zytose eine erhöhte Synthese von PGE_1 zeigen und Thromboxan A_2 synthetisieren (115).

Um die von LPS induzierte Prostaglandinsynthese in anderen Zellen als Makrophagen zu untersuchen, wurden Milzzellen der Maus (1×10^6/ml) und Granulozyten vom Rind (1×10^6/ml) für 24 Stunden mit LPS (10 ug) inkubiert und der Überstand im Radioimmunassay auf Prostaglandin E_2 getestet.
Es wurde gefunden, dass unter den angewandten Bedingungen Milzzellen bei Inkubation mit LPS gegenüber Kontrollen nicht zu einer erhöhten Synthese von PGE_2 stimuliert werden konnten (Tab. 8).

Tabelle 8: LPS-induzierte Prostaglandinsynthese (PGE_2) in Milzzellen

Versuch	Synthese von PGE_2 bei Inkubation	
	mit	ohne
	Lipopolysaccharid	
	ng/ml	ng/ml
1	3.9	3.8
2	5.4	5.5

Granulozyten:

Granulozyten vom Rind wurden in 2 Versuchen für 24 Stunden mit LPS inkubiert. Im Überstand konnte im Radioimmunassay keine prostaglandinähnliche Aktivität festgestellt werden.

4.4. Versuche mit Makrophagen aus LPS-hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen.

Werden grössere Mengen von Lipopolysaccharid (1000 ug) in Versuchstiere (Maus, Kaninchen) injiziert, so sterben die Tiere. Vor kurzem konnten Greer und Rietschel (76) zeigen, dass LPS-induzierte Letalität in Mäusen durch vorherige Injektionen subletaler Dosen Endotoxin modifiziert werden kann.
In diesem System wurden die Mäuse zweimal mit LPS behandelt. Die erste Injektion wurde mit einer geringen Dosis (1-10 ug/Maus) vorgenommen und mit einer Zweitinjektion wurde diejenige LPS-Dosis ermittelt, welche bei 50 % der gespritzten Mäuse innerhalb von 24 Stunden den Tod herbeiführt (LD_{50}).
Es wurde gezeigt, dass diese Letaldosis signifikant abhängig war von der Zeit zwischen den Behandlungen (Abb. 20). Es wurden zwei ausgeprägte Stadien in der Empfindlichkeit der Mäuse gegenüber den toxischen Wirkungen des LPS gefunden. Erfolgte die Zweitinjektion 24 Stunden nach der Vorbehandlung, also an Tag 1, war die LD_{50} signifikant niedriger, d.h. die Mäuse waren ausgesprochen empfindlich und starben schon bei weitaus geringeren Mengen LPS (330 ug/Maus) als unbehandelte Tiere (1200 ug/Maus). Die Phase der Überempfindlichkeit der Tiere gegenüber LPS-Letalität wurde als Hyperreaktivität bezeichnet. Wurden dagegen die Mäuse 96 Stunden (Tag 4) zum zweiten Mal gespritzt, so war die LD_{50} höher (5200 ug) als bei unbehandelten Tieren (1200 ug). Die Mäuse waren durch die Vorbehandlung mit LPS gegen dessen letale Wirkung wesentlich unempfindlicher geworden. Die Phase der Resistenz gegen LPS-Letalität wurde als Toleranz bezeichnet.
Es erschien nun interessant zu untersuchen, ob Zellen des RES insbesondere Makrophagen, an der Vermittlung von Hyperreaktivität und Toleranz beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde getestet, ob Makrophagen aus

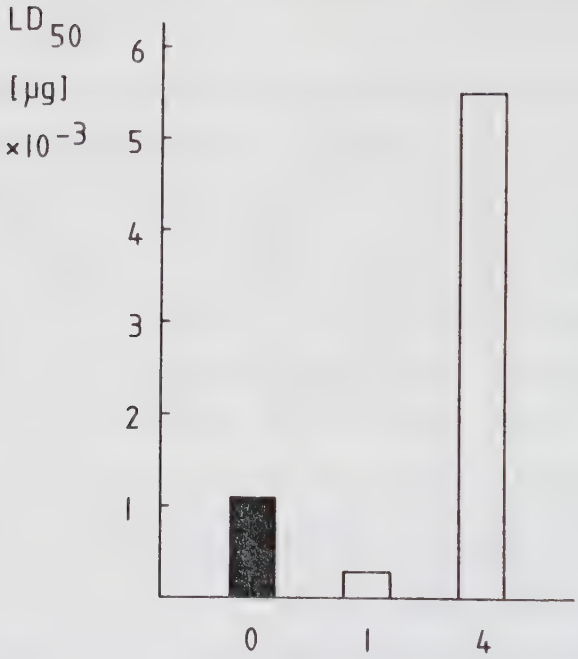


Abb. 20: Stadien der Hyperreaktivität und Toleranz von Mäusen bezüglich der letalen Wirkung von LPS.
0 = unbehandelte Mäuse
1 = hyperreaktive Mäuse
4 = tolerante Mäuse

LPS-vorbehandelten Tieren Unterschiede in ihrer (LPS-induzierten) Prostaglandinsynthese zeigten und ob sich darüberhinaus die veränderte Reaktivität der Tiere in einer Veränderung anderer Eigenschaften der Makrophagen äussert.

4.4.1 LPS-induzierte Prostaglandinsynthese in Makrophagen aus hyperreaktiven und toleranten Mäusen

Makrophagen wurden Kontrolltieren (Tag 0) und LPS-vorbehandelten Mäusen Tag 1 und Tag 4 entnommen und mit steigenden Mengen LPS für 24 Stunden

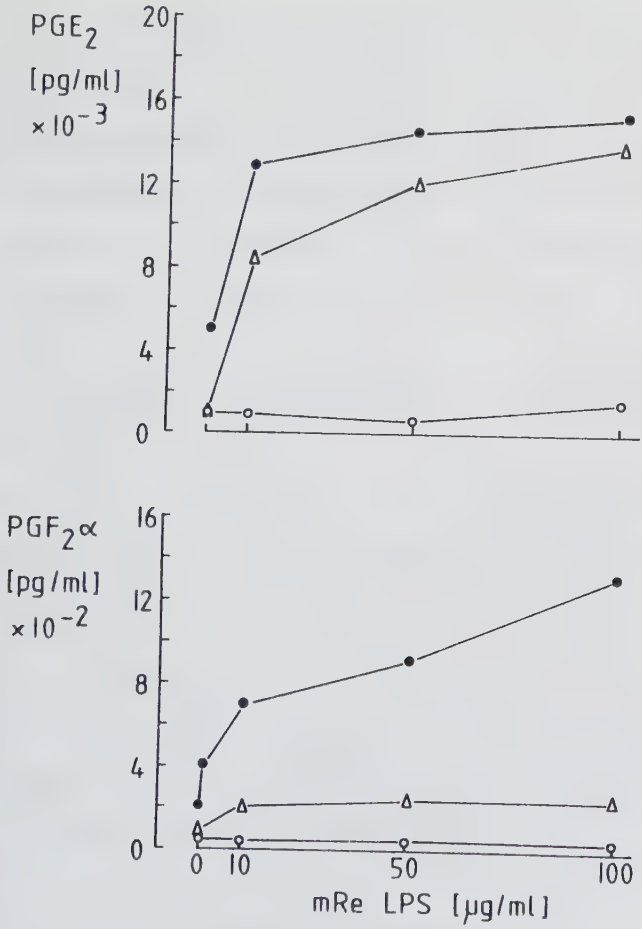


Abb. 21: Prostaglandinsynthese von Makrophagen aus unbehandelten (Δ—Δ) hyperreaktiven (●—●) und toleranten (o—o) Mäusen bei Inkubation mit LPS

bei 37°C inkubiert (1 x 10^6 Zellen/ml). Nach dieser Zeit wurden die Überstände abgenommen und im Radioimmunassay auf PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ getestet.

Es zeigte sich, dass gegenüber Makrophagen aus Kontrolltieren (Tag 0) Makrophagen aus hyperreaktiven Tieren (Tag 1) bei Inkubation mit LPS mit einer erhöhten Ausschüttung von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ antworteten (Abb. 21). Makrophagen aus toleranten Tieren (Tag 4) waren durch die Inkubation mit LPS jedoch nicht zu einer erhöhten Produktion von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ anzuregen; sie zeigten bezüglich der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese einen refraktären Zustand.

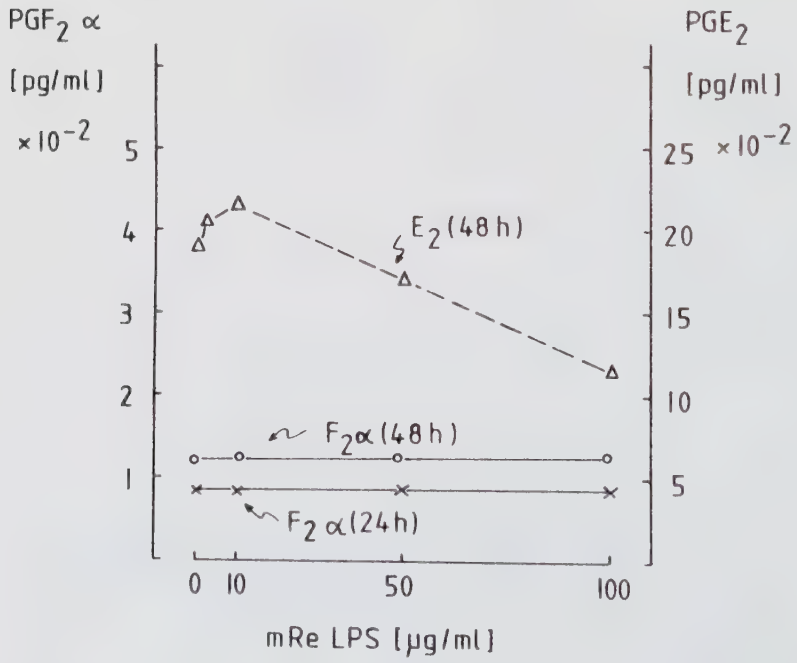


Abb. 22: Prostaglandinsynthese von Makrophagen Tag 4 nach Vorinkubation von 24 bzw. 48 Stunden im Kulturmedium bei LPS-Stimulation.

Um zu testen, ob der refraktäre Zustand von Tag 4-Makrophagen in vitro zu durchbrechen sei, wurden Zellen vor der Behandlung mit LPS 24 Stunden bzw. 48 Stunden in Kulturmedium inkubiert, gewaschen und dann mit LPS (10-100 ug) für 24 Stunden inkubiert. Bei den Zellen mit einer Vorinkubationszeit von 48 Stunden wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt. Es zeigte sich (Abb. 22) keine Erhöhung der Prostaglandinsynthese durch LPS-Behandlung (bei 10 ug: 0,09 ng $PGF_{2\alpha}$; 2,2 ug PGE_2), wie sie bei Makrophagen aus unbehandelten Mäusen beobachtet wird (bei 10 ug : 0,2 ng $PGF_{2\alpha}$; 9 ng PGE_2).
Der refraktäre Zustand der Makrophagen von Tag 4 war durch Vorinkubation der Zellen in vitro und mehrmaliges Waschen nicht revertierbar.

4.4.2. Zymosaninduzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen aus LPS-hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen.

Um Auskunft darüber zu erhalten, ob die durch LPS Vorbehandlung der Mäuse bewirkten Unterschiede in der Prostaglandinsynthese der Makrophagen stimulusspezifisch sind, also nur bei Inkubation der Zellen mit LPS auftreten, wurde die Synthese von $PGF_{2\alpha}$ auch nach Inkubation mit Zymosan bestimmt. Makrophagen (1×10^6 Zellen/ml) wurden für 1 Stunde bei 37^oC mit Zymosan (500 ug/ml) inkubiert. Nachdem die Zymosanpartikel abzentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge, 10 min., 3000 Upm) waren, wurde der Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ im Überstand mit Hilfe des Radioimmunassays bestimmt.

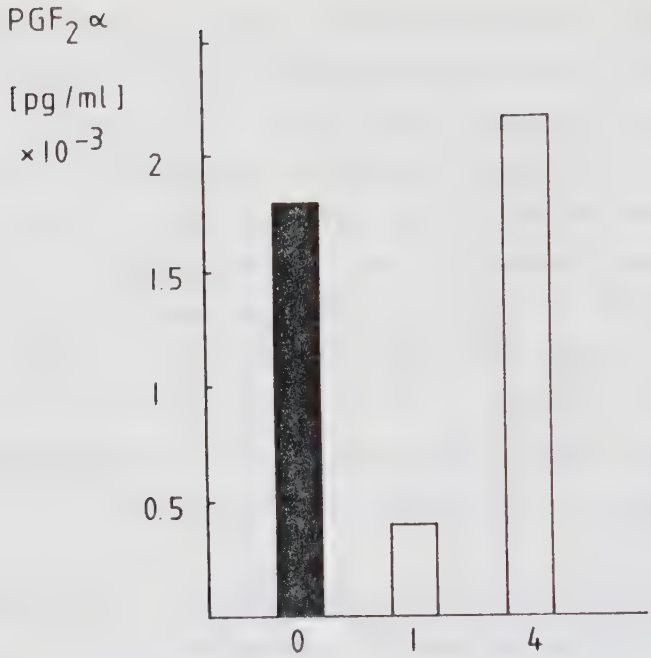


Abb. 23: Prostaglandinsynthese ($PGF_{2\alpha}$) von Makrophagen aus vorbehandelten Mäusen bei Inkubation mit Zymosan (0 = unbehandelte, 1 = hyperreaktive, 4 = tolerante Mäuse).

Wie Abb. 23 zeigt, war bei Makrophagen aus hyperreaktiven Tieren (Tag 1) die Kapazität $PGF_{2\alpha}$ zu synthetisieren gegenüber Zellen aus unbehandelten Tieren unterdrückt. Makrophagen aus toleranten Mäusen (Tag 4) dagegen zeigten eine mit Kontrollen (Tag 0) vergleichbare Produktion von $PGF_{2\alpha}$. Diese Befunde zeigen, dass die Prostaglandinsynthese von Makrophagen Tag 4 ausschliesslich gegenüber LPS refraktär ist, gegenüber Zymosan scheint sie normal zu funktionieren. Dies bedeutet, dass die beobachtete Toleranz der Tag 4-Makrophagen LPS-spezifisch ist.

4.4.3. LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen vorbehandelter Mäuse in Gegenwart von conditioned Medium.

Kurland und Moore berichteten 1977 (116), dass von Makrophagen produzierte Prostaglandine die Differenzierung und Kolonienbildung von Makrophagenvorläuferzellen beeinflusste. Die Prostaglandine traten dabei als Inhibitoren einer kolonienbildenden Aktivität (CSA = Colony Stimulating Activity) in Erscheinung, einer Aktivität die von reifen Makrophagen produziert wurde und bei der es sich wahrscheinlich um ein Protein handelte, Kurland et al. konnten 1978 (117) weiterhin bei Makrophagen der LPS-unempfindlichen C3H/HeJ Maus, bei denen LPS nicht als Stimulus zur Prostaglandinsynthese wirkt, durch Zugabe von CSA eine erhöhte Prostaglandinsynthese beobachten. Auf der Suche nach den Ursachen des refraktären Zustandes der Makrophagen Tag 4 bezüglich der LPS induzierten PG-Synthese erschien es deshalb lohnend diese Makrophagen in Gegenwart von CSA mit LPS zu inkubieren. Im vorliegenden Fall wurde als Quelle für CSA ein Überstand einer Fibroblastenlinie (L-cell-conditioned Medium) verwendet, dessen Anwesenheit auch zur Kultur von Makrophagen aus Knochenmarkzellen notwendig ist (vgl. 3.6.).

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden in der unter (4.4.1.) beschriebenen Art durchgeführt, wobei LPS in steigenden Mengen zu Makrophagen (Tag 4) zugegeben wurde und das Kulturmedium aus 70 % Eagles Medium und 30 % CSF-haltigem L-cell conditioned Medium bestand. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Überstände im Radioimmunassay auf ihren Gehalt an $PGF_{2\alpha}$ getestet.

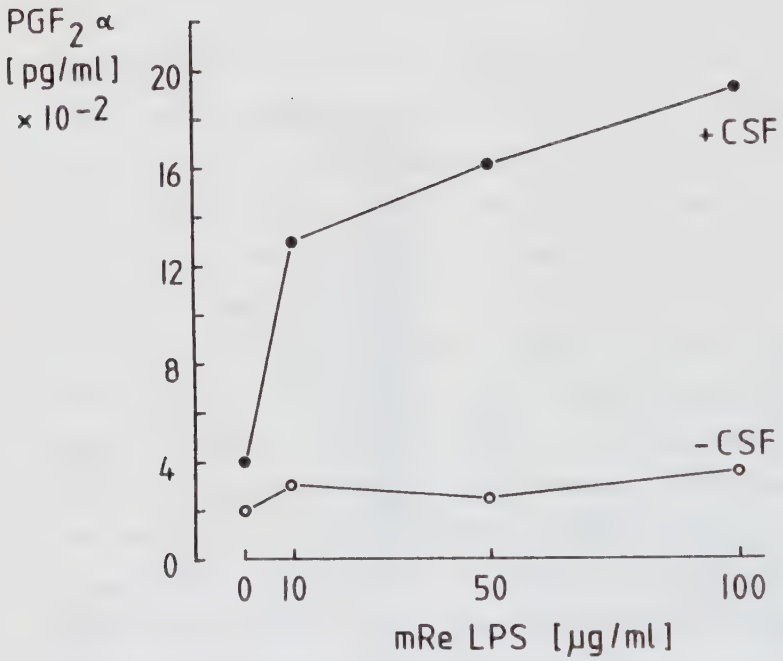


Abb. 24: LPS-induzierte Synthese von $PGF_{2\alpha}$ in Makrophagen aus toleranten Tieren in Gegenwart von CSF-haltigem Medium.

Es zeigte sich (Abb. 24), dass bei Anwesenheit von kolonienstimulierender Aktivität (CSF-haltiges Medium) die Makrophagen aus toleranten Mäusen mit LPS zu einer Synthese von $PGF_{2\alpha}$ angeregt werden konnten (mit 10 ug: 1,3 ng/ml), die mit der von Kontrollen aus unbehandelten Mäusen vergleichbar war (zwischen 0,8 - 2 ng/ml). Dies bedeutet, dass der refraktäre Zustand der Makrophagen Tag 4 durch CSF-haltiges Medium aufgehoben werden kann.

4.4.4. Cytotoxische Wirkung von Lipopolysaccharid auf Makrophagen aus LPS-hyperreaktiven und LPS-toleranten Mäusen.

Es ist bekannt, dass LPS cytolytisch auf Zellen wirkt (60). Um eine Information zu erhalten, ob sich die gesteigerte, bzw. verminderte Empfindlichkeit der LPS-vorbehandelten Mäuse auf zellulärer Ebene äussert, wurden Makrophagen aus Mäusen entnommen, die 24 Stunden vorher mit 10 ug LPS (Tag 1) oder 96 Stunden vorher (Tag 4) mit 10 ug LPS gespritzt worden waren. Als Kontrollen dienten Makrophagen aus unbehandelten Mäusen. Die verschiedenen Makrophagenkulturen wurden mit steigenden Konzentrationen LPS für 24 Stunden inkubiert und nach dieser Zeit die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Lysierte (Membrandefekte) Makrophagen waren durch Aufnahme des Farbstoffes erkennbar.

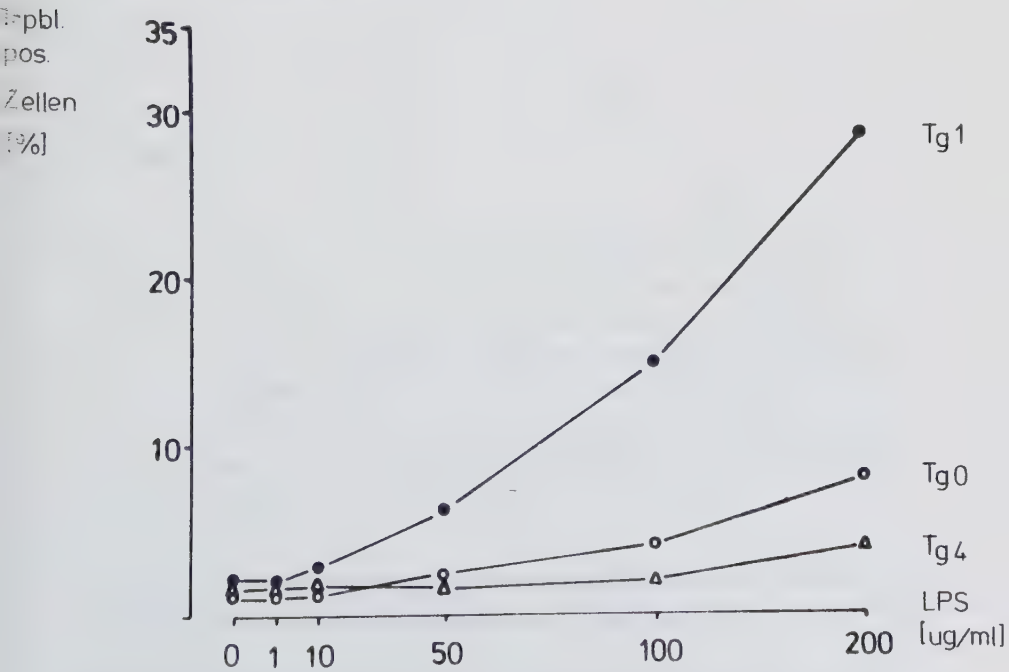


Abb. 25: Trypanblauaufnahme von LPS-behandelten Makrophagen aus unbehandelten, hyperreaktiven und toleranten Mäusen.

Eine quantitative Analyse ist in Abb. 25 wiedergegeben. Es wurde gefunden, dass die Makrophagen aus hyperreaktiven Mäusen gegenüber den toxischen Wirkungen von LPS wesentlich empfindlicher sind als Makrophagen aus toleranten, bzw. aus unbehandelten Tieren. Bei geringen Dosen (10 ug LPS/ml) sind die Unterschiede nicht deutlich zu erkennen (Tag 0:2 %, Tag 1:4 %, Tag 4:1,5 %). Wurden jedoch grössere Mengen LPS getestet (100 ug) werden die Unterschiede deutlicher (Tag 0:5 %, Tag 1:20 %, Tag 4:3 %).

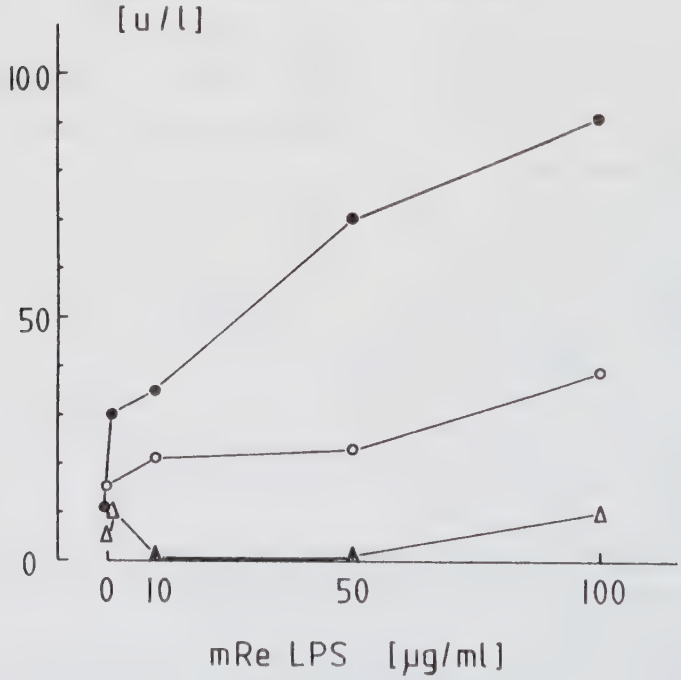


Abb. 26: LDH-Aktivität in Überständen von LPS-behandelten Makrophagen aus unbehandelten (△——△), hyperreaktiven (●——●) und toleranten (o——o) Mäusen.

Ein anderes Mass für die Zellyse stellt die Aktivität des cytosomalen Enzyms Lactatdehydrogenase dar, welches von Phagozyten nur bei Schädigung der Zellmembran in das umgebende Medium abgegeben wird. Zellen Tag 0, Tag 1, Tag 4 wurden aus unbehandelten, hyperreaktiven und toleranten Mäusen präpariert und gleich behandelt wie für den Test zur Aufnahme von Trypanblau beschrieben (s.o.). Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurden die Überstände auf LDH Aktivität im Überstand getestet.

Das Ergebnis dieses Tests ist in Abb. 26 dargestellt. Sie zeigt, dass die Makrophagen aus hyperreaktiven Mäusen bei Inkubation mit LPS eine wesentlich höhere LDH-Aktivität in den Überstand abgeben als Makrophagen aus unbehandelten, bzw. toleranten Tieren. Dieses Ergebnis stellt einen starken Hinweis auf die vermehrte Cytolyseaktivität des LPS in Tag 1 Makrophagen dar und bestätigt damit die durch Trypanblauaufnahme gefundenen Ergebnisse, dass Makrophagen aus hypersensiblen Mäusen auch besonders empfindlich für die toxischen Effekte von LPS in vitro sind.

Zu den beschriebenen Versuchen ist anzumerken:

> Die Unterschiede der Aktivität der LDH im Überstand in (4.2.) und (4.4.4.) erklären sich aus der Tatsache, dass in (4.2.) unter den Bedingungen eines Mikrotests, in oben beschriebenen Versuchen unter den Bedingungen eines Makrotests gearbeitet wurde. Das bedeutet, dass einmal (Makro) 0,1 ml Überstand pro 3 ml Testvolumen und das andere Mal (Mikro) 0,1 ml Überstand pro 0,5 ml Testvolumen eingesetzt wurde. Die unterschiedlichen Aktivitäten spiegeln also die unterschiedliche Endkonzentration der im Test eingesetzten Enzymmenge wieder.

4.4.5. Funktioneller Vergleich von Makrophagen aus hyperreaktiven und toleranten Mäusen (Phagozytose von Zymosan).

Um mögliche funktionelle Unterschiede zu erfassen, die durch die LPS-Vorbehandlung verursacht wurden, wurde die Phagozytosekapazität der Makro-

phagen von Mäusen Tag 0, Tag 1 und Tag 4 bestimmt.

Makrophagen wurden für 20 min. mit fluoreszenzmarkiertem Zymosan inkubiert, nach sorgfältigem Waschen des nicht aufgenommenen Zymosans in Methanol fixiert und ausgezählt.

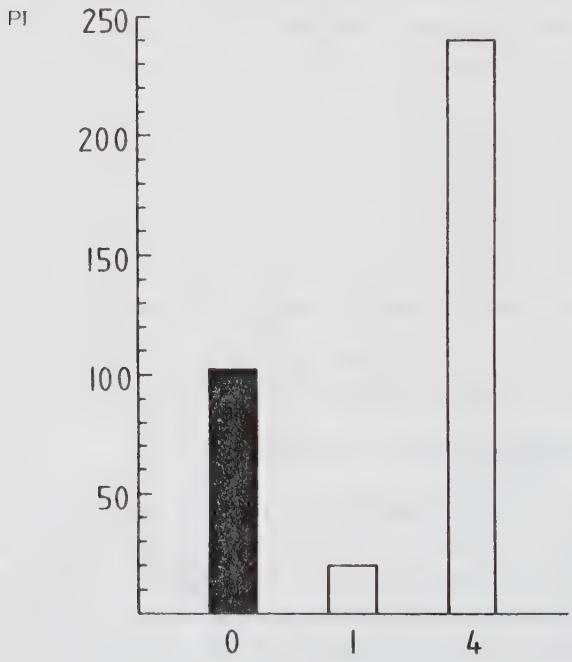


Abb. 27: Phagozytosekapazität von Makrophagen aus unbehandelten (0), hyperreaktiven (1) und toleranten (4) Mäusen.(PI = Phagozytoseindex)

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 27 dargestellt.

Makrophagen aus hyperreaktiven Mäusen zeigen gegenüber solchen aus unbehandelten Mäusen (PI = 100) eine stark reduzierte Phagozytosekapazität (PI = 20).

Dagegen bewirkte die LPS-Vorbehandlung die zur LPS Toleranz führt (Tag 4) in den Makrophagen eine gesteigerte Phagozytosekapazität (PI = 235). Aus diesen Versuchen lassen sich einige Eigenschaften der Makrophagen aus hyperreaktiven, bzw. toleranten Mäusen zusammenfassen:

Makrophagen aus hyperreaktiven Mäusen verfügen über:

1. erhöhte LPS-induzierte Prostaglandinsynthese (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$)
2. erhöhte Suszeptibilität gegen LPS-Cytotoxizität
3. erniedrigte Phagozytosekapazität (Zymosan)
4. erniedrigte Zymosan-induzierte Prostaglandinsynthese ($PGF_{2\alpha}$)

Makrophagen aus toleranten Mäusen verfügen über:

1. erniedrigte LPS-induzierte Prostaglandinsynthese (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$)
2. erniedrigte Suszeptibilität gegen LPS-Cytotoxizität
3. erhöhte Phagozytosekapazität (Zymosan)
4. normale Zymosan-induzierte Prostaglandinsynthese ($PGF_{2\alpha}$)

4.5. Analyse von Prostaglandinen in Makrophagenüberständen mit Hilfe der Gaschromatographie

In den bis hierher beschriebenen Versuchen wurden Prostaglandine (PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$) mit Hilfe des Radioimmunassays analysiert. Es konnte dabei nicht ausgeschlossen werden, dass sich in Überständen auch Prostaglandine mit nur einer Doppelbindung (PGE_1 und $PGF_{1\alpha}$) befanden; diese wären aufgrund ihrer Kreuzreaktion mit den verwendeten Antiseren miterfasst worden. Um eine eindeutige Identifizierung der nach LPS-Inkubation gebildeten Prostaglandine zu ermöglichen, wurden deshalb Makrophagenüberstände mit Hilfe der Gaschromatographie untersucht. Hierzu mussten zunächst geeignete Vorreinigungsmethoden, geeignete Derivatisierungen für die GLC und stationäre

Phasen gefunden werden. Die Auswahl dieser Methoden und Bedingungen wird im Folgenden beschrieben.

4.5.1. Isolierung und Vorreinigung von Prostaglandinen aus Makrophagenüberständen

4.5.1.1. Extraktionsmethoden

Sollten Prostaglandine gaschromatographisch analysiert werden, so mussten sie zur weiteren Reinigung und Derivatisierung aus dem wässrigen Überstand extrahiert werden. Dafür geeignete Methoden, die in der Literatur beschrieben werden, sind ebenso zahlreich wie die Gewebe oder Flüssigkeiten aus denen sie extrahiert werden. Einen guten Überblick bieten derzeit Hensby (118) und J.C. Frölich (26).

1.) Extraktion von Prostaglandinen in organische Phasen (118)

Eine erfolgversprechende Methode zur Isolierung der Prostaglandine besteht im Ausschütteln dieser Komponenten aus der wässrigen Phase in ein geeignetes organisches Lösungsmittel.

In physiologischen Flüssigkeiten (pH 7.2) ist die Carboxylgruppe der Prostaglandine ionisiert. Durch Ansäuern der Makrophagenüberstände werden die Prostaglandine in die freien Säuren überführt und somit in ein organisches Lösungsmittel extrahierbar.

Verschiedene polare funktionelle Gruppen wie Hydroxy-, Carboxyl-, und Ketofunktionen verleihen den Prostaglandinen einen polaren Charakter, sodass als organisches Lösungsmittel Essigsäureäthylester gewählt wurde.

Ein sehr wichtiger Schritt nach der Extraktion ist das Waschen der organischen Phase mit Wasser. Prostaglandine vom E-Typ spalten bei pH-Werten unter 3 leicht Wasser ab und bilden PGA. Deshalb können auch geringe Spuren

verbleibender Säure in der organischen Phase, die beim darauffolgenden Einengen am Rotationsverdampfer stark konzentriert wird die Analyse nachhaltig beeinflussen.

2.) Extraktion von Prostaglandinen mittels Extrelutsäulen

Eine andere Methode, die sich für die Isolierung der Prostaglandinmethode anbot war ihre Extraktion mit "Extrelut" Säulen, deren Vorteil vor allem in ihrer einfachen Handhabung besteht.

3.) Vergleich der Extraktionsmethoden

Zur Wahl der geeigneten Methode wurde eine Bewertung der beiden zur Verfügung stehenden Verfahren durchgeführt (Ausschütteln und Extrelutsäulen).

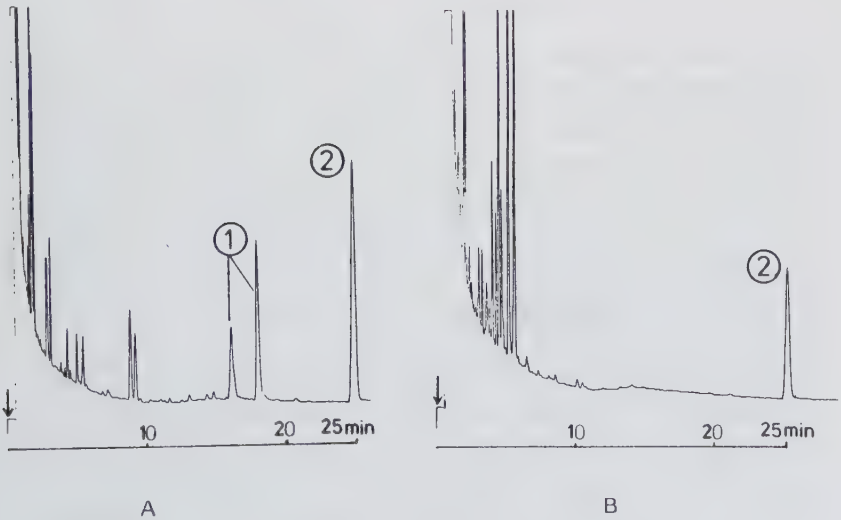


Abb. 28: Gaschromatogramme zum Vergleich der Extraktionsmethoden.
A : Ausschütteln
B : Extrelut
1 : Syn-, anti-Isomeren des PGE_2-Derivates
2 : 2-Hydroxylignocerat (TMSi, ME) = Innerer Standard

Jeweils 75 ug Prostaglandin E_2 wurden in 20 ml Eagles Medium gelöst und zum einen durch Ausschütteln und zum andern mit Extrelutsäulen extrahiert. Die Extrakte wurden zur gaschromatographischen Analyse in die Methylester-Methoxim-Trimethylsilylderivate umgewandelt. Als interner Standard diente 2-Hydroxylignocerinsäure. Chromatographiert wurde auf einer Kapillarsäule OV 101, mit Temperaturprogramm (Abb. 28).

Wie aus Abb. 28 hervorgeht, konnte nach Extraktion mit Extrelutsäulen mit der Gaschromatographie kein PGE_2 mehr detektiert werden (Abb. 28B). In der Probe, die durch Ausschütteln (Abb. 28A) gewonnen wurde, fanden sich 91 % des eingesetzten PGE_2 wieder (68 ug von eingesetzten 75 ug). Da die Extrelutsäule offensichtlich die Prostaglandine zurückhält, schied sie als Verfahren zur Extraktion aus.

4.5.1.2. Flüssigkeitschromatographie

1.) Auftrennung der Prostaglandine in Gruppen an Kieselsäure

Es wurden Prostaglandine an Kieselsäure in Gruppen (E,F,etc.) aufgetrennt (80). Solche Prostaglandine, die sich nur in der verschiedenen Anzahl ihrer Doppelbindungen unterscheiden, konnten nicht separiert werden. So werden z.B. auch in der A-Gruppe E- und F-Metaboliten, sowie in der E-Gruppe Thromboxan B_2 cochromatographiert. Die Auftrennung in Gruppen und die erzielte Ausbeute werden in folgendem Experiment (s. Tab. 9) deutlich, wo $(^3H)PGE_2$ und $(^3H)PGF_{2\alpha}$ als Testsubstanzen chromatographiert wurden.

Es zeigte sich, dass $(^3H)PGE_2$ und $(^3H)PGF_{2\alpha}$ getrennt wurden (Tab. 9). Es fanden sich von $(^3H)PGE_2$ in der F-Fraktion 4 % in der E-Fraktion wurden 8 % des eingesetzten $(^3H)PGF_{2\alpha}$ gefunden.

Die Methode ergibt bei einer schnellen Trennung eine relativ gute Ausbeute ($PGF_{2\alpha}$ 64 % und PGE_2 71 %).

Tabelle 9: Auftrennung von (^{3}H)PGE$_2$ und (^{3}H)PGF$_2$ an Kieselsäure

Fraktion	Ausbeute an Prostaglandin nach Kieselsäure Chromatographie			
	(^{3}H)PGE$_2$ (1)		(^{3}H)PGF$_{2\alpha}$ (2)	
	cpm	Ausbeute (%)	cpm	Ausbeute(%)
A	1955	6	746	2
E	23 137	71	2984	8
F	1304	4	23880	64

(1) Aufgetragen wurde: 32 587 cpm

(2) Aufgetragen wurde: 37 312 cpm

Die Vorteile dieser Methode liegen in ihrer einfachen Handhabung und ihrer Schnelligkeit, mit der eine Trennung erreicht werden konnte. Sie ist besonders dann geeignet, wenn sich als analytischer Schritt ein spezifisches Detektionsverfahren anschliesst, wie z.B. die kombinierte GC-MS. Sie ist jedoch nur beschränkt anwendbar, wenn im Anschluss gaschromatographisch analysiert wird. Der Hauptnachteil dieser Methode liegt darin, dass die Proben noch stark mit anderen Substanzen kontaminiert sind, die nicht von den Prostaglandinen abgetrennt werden können und die GC-Analyse stören. Die Chromatographie über Kieselsäure konnte deshalb als alleiniger Reinigungsschritt vor der gaschromatographischen Analyse nicht eingesetzt werden.

2.) Auftrennung der Prostaglandine in Gruppen an Sephadex LH-20

Wie bei der Chromatographie an Kieselsäure werden die Prostaglandine auch an Sephadex LH-20 in Gruppen getrennt (81). Die Chromatographie an Sephadex LH-20 stellt ein Verfahren dar, dessen besondere Eignung für die vorliegende Problemstellung sich in der gaschromatographischen Analyse von Makrophagenüberständen zeigen. Reinigung an Sephadex LH-20 genügt als einziger Reinigungsschritt, wenn die Prostaglandine der E- und F-Fraktionen zu analysieren sind.

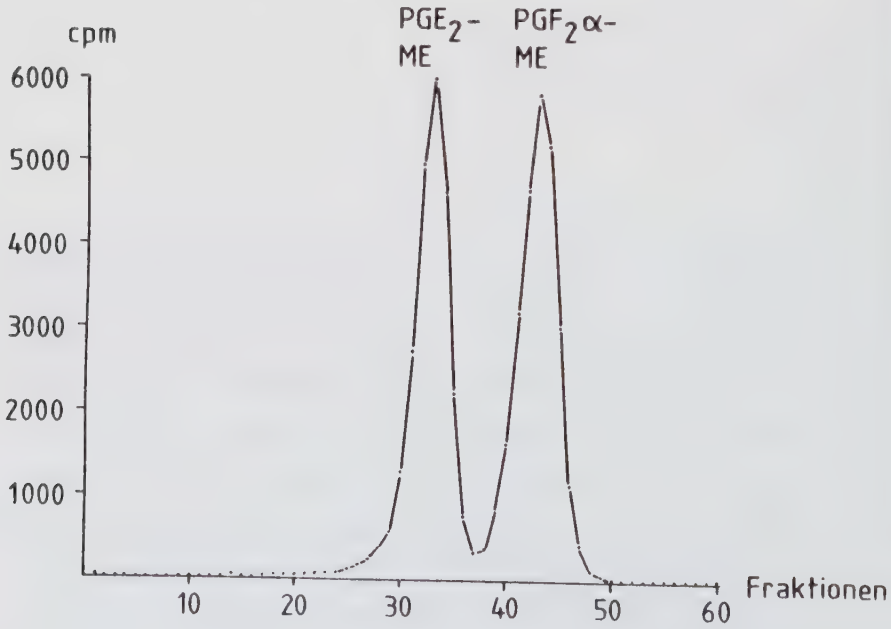


Abb. 29: Trennung von (^{3}H)PGE$_2$-ME und (^{3}H)PGF$_{2\alpha}$-ME an Sephadex LH-20

Wie Abbildung 29 zeigt, werden die Prostaglandine E_2 und F_2 in der Form ihrer Methylester gut getrennt. Die Chromatographie an Sephadex LH-20 zeichnet sich neben ihrer guten Reproduzierbarkeit auch durch ihre hohe Ausbeute des getrennten Materials aus. Dies wird aus folgenden Versuchen klar. Die eingesetzten Mengen Prostaglandin entsprechen etwa einer Menge an PGE_2 und PGF_2 von jeweils 1-2 ng.

Eingesetzte cpm PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$	: 51213	
cpm Fraktion E	: 23806	
cpm Fraktion F	: 26240	
Rückgewinnung E, F	: 50046	entspricht 97,7 %

In einem anderen Experiment wurden 19255 cpm (^{3}H)$PGF_{2\alpha}$ eingesetzt und 18946 cpm in der F-Fraktion wiedergefunden (98,3 %).
Selbst bei Einsatz von sehr geringen Mengen (^{3}H)PGE_2 wurde eine gute Ausbeute erzielt. In einem entsprechenden Experiment wurden ca. 100 pg (^{3}H)PGE_2 (1082 cpm) an Sephadex LH-20 chromatographiert. In der E-Fraktion wurden 835 cpm wiedergefunden. Dies entspricht einer Ausbeute von 82 %.

Gewisse Nachteile der Chromatographie an LH-20 sind in der relativ aufwendigen Herstellung der Säulen und in der langen Dauer die jeder Lauf in Anspruch nimmt zu sehen.
Aufgrund der überlegenen Eigenschaften der Sephadexsäulen wurden diese in den meisten Fällen zur Vorreinigung der aus Makrophagenüberständen extrahierten Prostaglandine eingesetzt.

4.5.2. Gaschromatographie

4.5.2.1. Aufarbeitung der Proben

Die schematische Darstellung der Aufarbeitung der Prostaglandine gibt Schema 1

Wässriger Makrophagenüberstand
mit Tracer-^{3}HPG

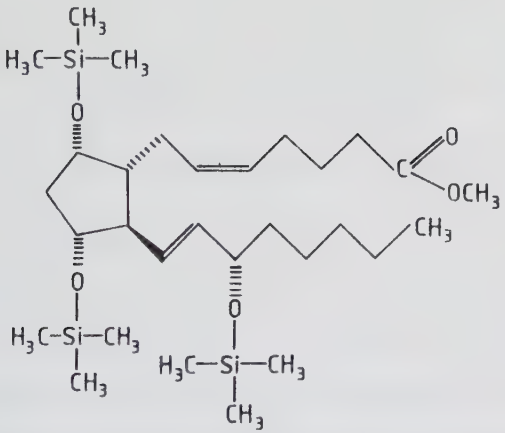
Extraktion in die organische Phase

Methylierung mit Diazomethan	Reinigung an Kieselsäure
Methylester	Gruppentrennung in A, E, F
Reinigung an LH-20	Methylierung mit Diazomethan
Gruppentrennung in A, E, F,	Oximierung mit Alkylhydroxylamin
Oximierung mit Alkylhydroxylamin	Trimethylsilylierung mit BSTFA
Trimethylsilylierung mit BSTFA	Zugabe des internen Standards
Zugabe des internen Standards	Aliquotnahme
Aliquotnahme	Bestimmung der Ausbeute (Radioaktivität)
Bestimmung der Ausbeute (Radioaktivität)	

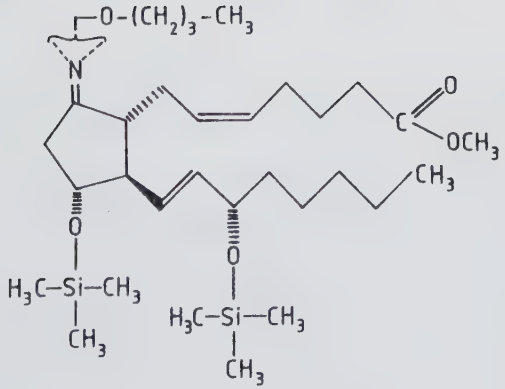
GASCHROMATOGRAPHIE

Schema 1: Aufarbeitung der Prostaglandine für die gaschromatographische Bestimmung

4.5.2.2. Die Prostaglandinderivate



(1)



(2)

Abb. 30: Die für die Gaschromatographie verwendeten Derivate von $PGF_{2\alpha}$ (1) und PGE_2 (2).

Um Substanzen gaschromatographisch analysieren zu können, müssen sie in eine Form gebracht werden, in der sie schnell, einheitlich und zersetzungsfrei verdampfbar sind. Prostaglandine sind dies als solche nicht. Mit ihren Carboxyl- und Hydroxylgruppen können sie Wasserstoffbrücken bilden, die ihren Siedepunkt heraufsetzen. Das α-Ketolystem das durch die Ketogruppe im Pentanring der Prostaglandine der E-Reihe gebildet wird, führt dazu, dass diese leicht pyrolytisch zersetzt werden können.

Um die Prostaglandine in eine Form zu bringen, die unter gaschromatographischen Bedingungen stabil ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die funktionellen Gruppen der Prostaglandine in folgender Weise modifiziert:

- die Carboxylgruppe wurde in den Methylester überführt (Diazomethan)
- die Ketogruppe wurde oximiert (O-Alkylhydroxylamin)
- die Hydroxygruppen wurden trimethylsilyliert (BSTFA)

In Abb. 30 sind die für die GLC verwendeten Derivate von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ dargestellt.

Bei der Derivatisierung sollten einige kritische Punkte beachtet werden. Das Diazomethan, welches zur Methylierung verwendet wird sollte in Äther überdestilliert werden, da es sonst leicht Verschmutzungen aus dem Nitrosomethylharnstoff enthalten kann. Der verwendete Äther muss eine sehr hohe Reinheit aufweisen und darf insbesondere keine Schwermetallionen enthalten, die als Katalysatoren einer Umwandlung des Diazomethans zu Polymeren wirken können. Um eine vollständige Methylierung der Carboxylgruppe zu gewährleisten, müssen die Proben zweimal mit Diazomethan behandelt werden.

Die Oximierung von PGE, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und TxB_2 liefert zwei Derivate, das syn- und anti-Oxim, welche gaschromatographisch getrennt werden können.

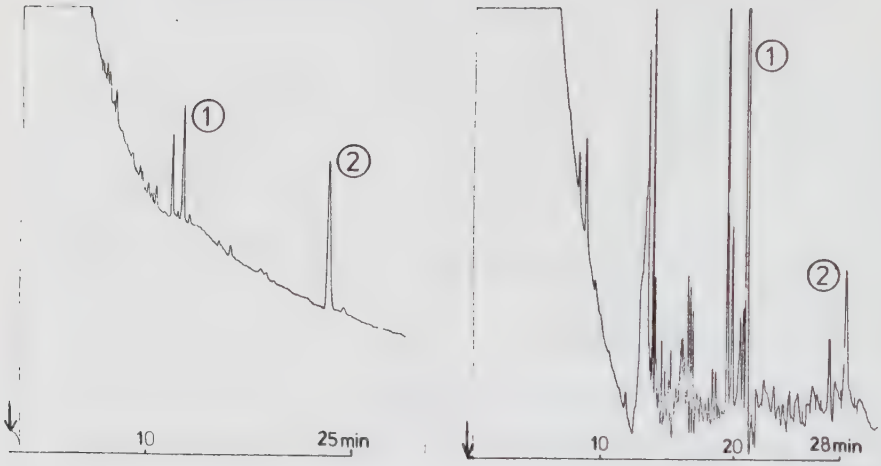
Die Dauer der Oximierung ist für die Qualität der Analyse von

Bedeutung. Proben, die nicht genügend lange reagierten, sind unteroximiert und weisen in der gaschromatographischen Analyse eine erhöhte Tendenz zur thermischen Zersetzung auf. Das zeigt sich im Chromatogramm darin, dass Peaks, welche zu Beginn des Chromatogramms eluiert werden stark vergrössert sind und Tailing aufweisen (Spaltprodukte, die durch pyrolytische Zersetzung entstehen). Dies kann leicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da die gemessene Radioaktivität in der zur Gaschromatographie vorbereiteten Proben nicht mehr mit den im Chromatogramm bestimmten Peakflächen zusammenfällt.

4.5.2.3. Injektionsverfahren

In der Gaschromatographie mit Kapillarsäulen wird als Injektionsverfahren meist die Strömungsgeteile (gesplittete) Aufgabeweise angewendet, um eine Überladung der Säule und damit Ungenauigkeiten der Analyse zu vermeiden. Handelt es sich um Proben, deren Konzentration im Lösungsmittel gross ist, erwachsen daraus keine Schwierigkeiten. Bei den hier untersuchten Proben kommen Prostaglandine nur in sehr geringen Konzentrationen vor, es handelt sich um Spurenanalysen. Gibt man bei der üblichen, d.h. strömungsgeteilten Injektion grosse Mengen der Probe auf, erhält man ein schlechtes, vom Lösungsmittelpeak dominiertes Chromatogramm (Abb. 31A). Konzentriert man andererseits die Probe auf ein kleines Volumen, läuft man Gefahr, einen Teil des Analysengemisches nicht mehr zu erfassen.

Abb. 31B zeigt ein Chromatogramm, das mit Hilfe einer splitlosen Injektion gewonnen wurde. Die beiden Chromatogramme (gesplittete und splitlose Injektion) zeigen deutlich, dass diese Verfahren für eine quantitative Auswertung ungeeignet sind. Es wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit das Injektionsverfahren mit dem Glasnadelinjektor verwendet. Die Abbildungen 32-35 verdeutlichen die Vorteile dieser Methode. Von jeder Substanz wurde pro Chromatogramm jeweils 10-30 ng injiziert.



A B

Abb. 31: A : Gesplittete Injektion 1 : Interner Standard

2 : $PGF_{2\alpha}$

Temp. 220°C; H_2; OV 101 25 m

B : Splitlose Injektion 1 : Interner Standard

2 : $PGF_{2\alpha}$

Temp. 80°C, 12 min.; Prog. 40°C/min., 220°C; H_2, OV 101 25 m

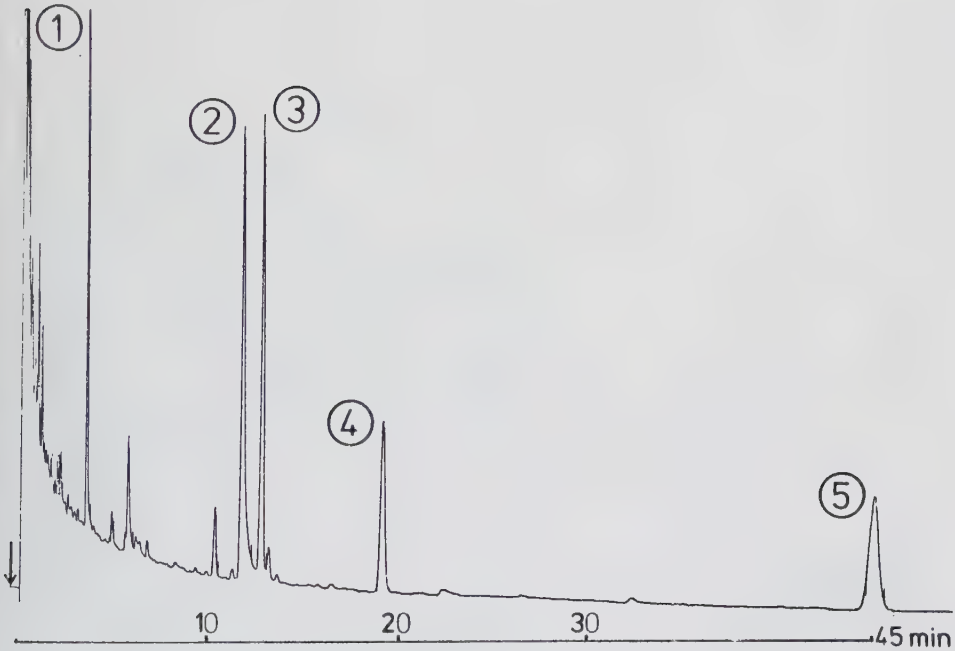
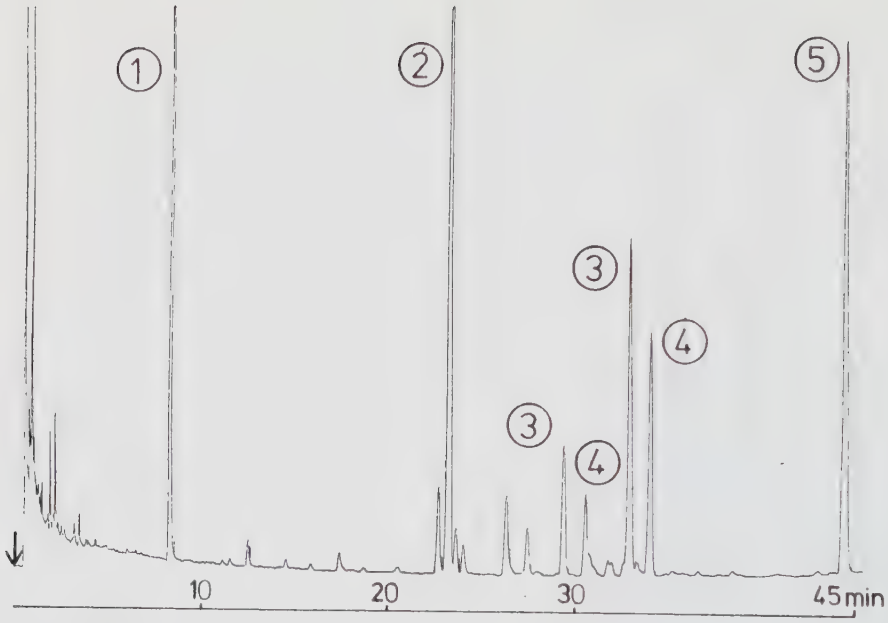
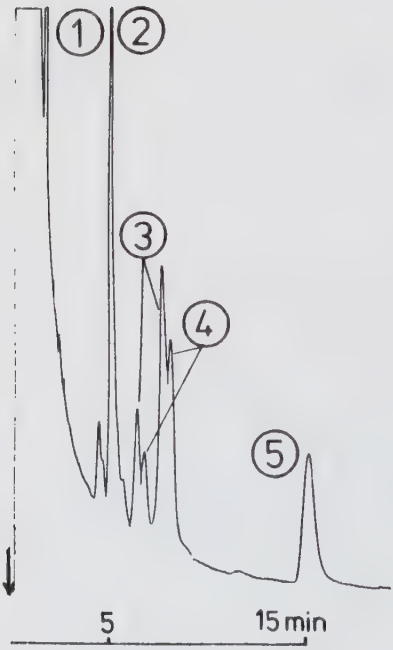


Abb. 32: Gaschromatogramm von $PGF_{2\alpha}$(ME, TMSi)
1 = Tetracosan, 2 = $PGF_{2\alpha}$, 3 = Octacosan, 4 = 2-OH-Lignocerat (ME, TMSi), 5 = Dotriacontan (Temp. 210°C isotherm, H_2, SE 54 25 m)



A



B

Abb. 33:

Gaschromatogramm von $PGE_{(1,2)}$ (ME, BuOx, TMSi)

1 = Tetracosan, 2 = Octacosan, 3 = PGE_2, 4 = PGE_1, 5 = Dotriacontan (Temp. 190°C, 5 min.; Prog. 1°/min. 235°C, H_2 SE 54 25 m).

A = Kapillare

B = gepackte Säule (SE 30 10%, 1.50 m, Temp.: 240°C)

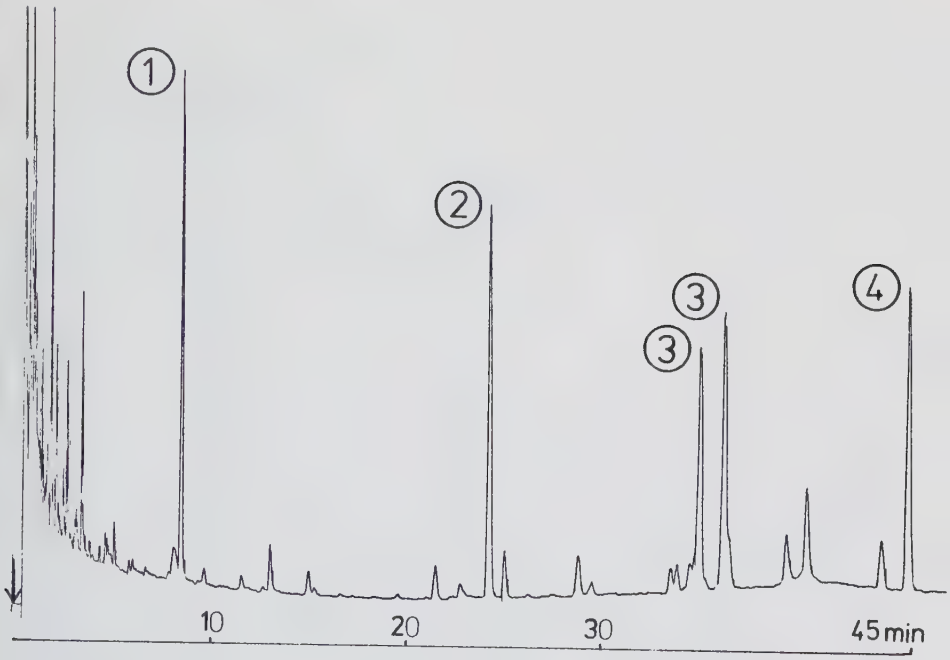


Abb. 34: Gaschromatogramm von 6-keto $PGF_{1\alpha}$(ME, BuOx, TMSi)
1 = Tetracosan, 2 = Octacosan, 3 = 6-$kPGF_{1\alpha}$, 4 = Dotriacontan
Bedingungen: s. Abb. 33.

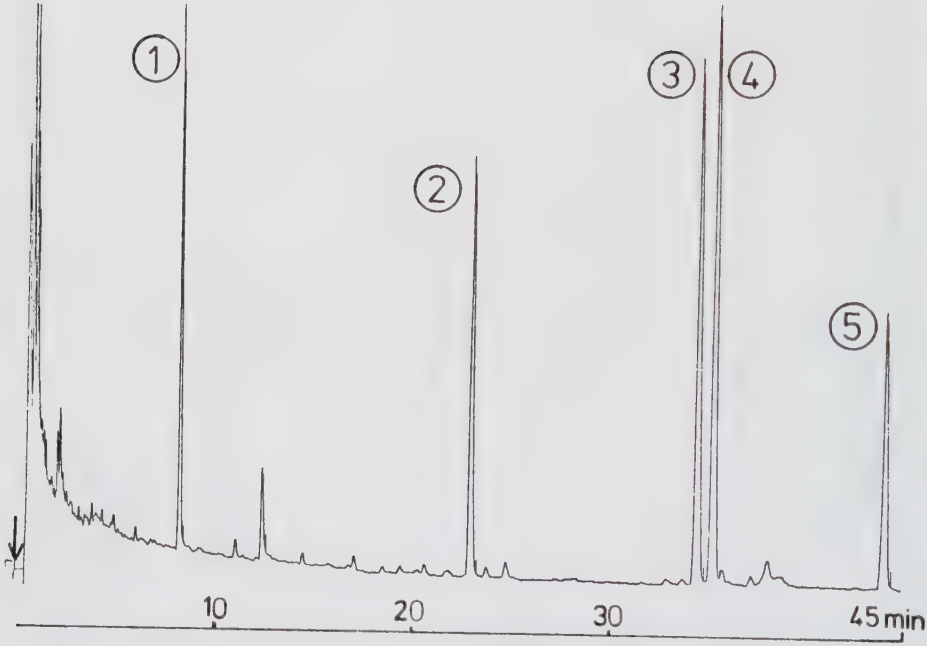


Abb. 35: Gaschromatogramm von TxB_2 (ME, BuOx, TMSi)
1 = Tetracosan, 2 = Octacosan, 3 = TxB_2, 4 = Dotriacontan
Bedinungen: s. Abb. 33.

4.5.2.4. Charakteristika der verschiedenen Säulentypen und flüssigen Phasen

Um die für die Auftrennung der Prostaglandine geeignetste stationäre Phase zu finden wurden verschiedene Eigenschaften einiger Phasen bestimmt. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Alle Bestimmungen wurden bei dem für die jeweilige Säule optimalen Trägergasstrom und isothermer Arbeitsweise (wenn nicht anders erwähnt) durchgeführt. Dieser wurde ermittelt, indem durch Variation des Trägergasstroms eine van Deemter Kurve aufgenommen wurde, wobei sich der optimale Trägergasstrom im Minimum der Kurve ergab. Als Beispiel ist in Abb. 36 die van Deemter Kurve gezeigt, die mit PGE_2 (dem grösseren Peak des syn-anti-Isomerenpaares) erhalten wurde.

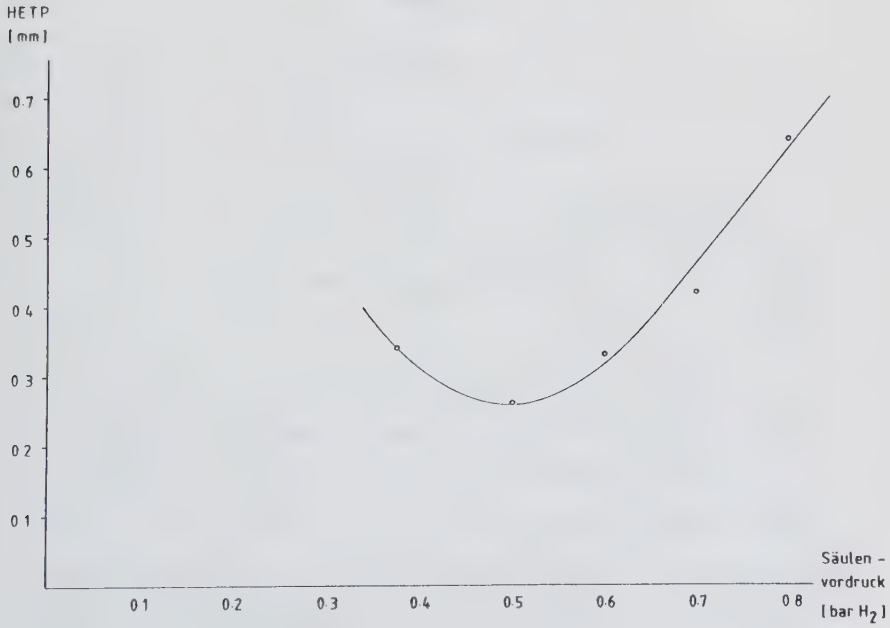


Abb. 36: Optimierungskurve nach van Deemter
Säule SE 54 Kapillarsäule, 220°C isotherm Trägergas H_2
HETP: Höhe eines theoretischen Bodens (Hight Equivalent of a Theorectical Plate)

Tabelle 10: Charakterisierung der verwendeten Säulentypen und flüssigen Phasen

Säule	PG	I_T^Y	TK(n:28)	Rs^{syn}_{anti}	$I^{SE\ 54\ ++}_{prog.}$	$Rs^{SE\ 54\ ++}_{progr.}$
			Kapillaren			
	E_1	2733,2790	n = 63966	0,62	-	-
OV 101^+	E_2	2711,2769	n/m=2559			
25 m	$F_{2\alpha}$	2727	h = 0,39			
	$6kF_{1\alpha}$	2840,2847				
	E_1	2941,3007			2939,3004	
			n = 94646	0,79		0,79
	E_2	2919,2987	n/m=3786		2917,2983	
SE 54^+	$F_{2\alpha}$	2771	h = 0,26		2768	
	$6kF_{1\alpha}$	3000,3024		0,70	3000,3024	0,78
	TxB_2	3022,3038		0,45	3020,3035	0,50
	E_1	3385,3451		0,17		
			n = 88302			
	E_2	3395,3469			-	-
Silar 5^+	$6kF_{1\alpha}$	3329,3350	n/m=3532	0,43		
CP						
25 m	TxB_2	3400,3408	h = 0,28	0,13		
			gepackte Säulen			
	E_1	2905,2969				
			n = 3716	0,12		
	E_2	2884,2952				
OV 1^+			n/m=2478	-	-	
1.5 m	$6kF_{1\alpha}$	2970,2995	h = 0,40			
	TxB_2	3011				
	E_1	2875,2939	n = 5497	0,09		
	E_2	2864,2929	n/m=3665		-	-
SE 30^+						
1,5 m	$6kF_{1\alpha}$	2940,2961	h = 0,27			
	TxB_2	2989				
	E_1	3253,3319	n = 2216			
Silar$^+$	E_2	3253,3319	n/m=1477	0,0	-	-
10C						
1.5 m	$6kF_{1\alpha}$	n.b.		n.b.		
	TxB_2	3260	h = 0,68			

Tab. 10: *Es wurden die Methylester, Methoxime, Trimethylsilyläther von PGE_1, PGE_2 $6kF_{1\alpha}$, eingesetzt

+Es wurden die Methylester, Butyloxime, Trimethylsilyläther von PGE_1, PGE_2, $6kF_{1\alpha}$ und TxB_2 eingesetzt.

++Temperaturprogramm: 190^oC/5 min. isotherm, mit 1^oC pro min. bis 235^oC Endtemperatur

Abkürzungen: PG: Prostaglandin

I_T^Y: Kovatsindex für die getestete Phase und die genannte Temperatur

TK: Trennkraft der Säule getestet für Oktakosan

n = Gesamtzahl der theoretischen Böden

n/m = Zahl der theoretischen Böden pro Meter

h = Höhe eines theoretischen bodens

Rs: Auflösung zwischen den syn- und anti-Isomeren der Oxime. Die Zahl zwischen E_1 und E_2 gibt die Auflösung zwischen den kleinen Isomerenpeaks von PGE_1 und PGE_2 an.

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, sind Kapillarsäulen für die vorliegende Problemstellung weit besser geeignet als gepackte Säulen. Alle Kapillaren weisen etwa die 20-fache höhere Anzahl an theoretischen Böden auf als gepackte Säulen. Entsprechend besser ist die Auftrennung der einzelnen Prostaglandinen, was sich in der Trennung von PGE_1 und PGE_2 am deutlichsten zeigt: keine der gepackten Säulen kann diese beiden Substanzen vollständig trennen. Bei Kapillaren erwies sich das Silikonöl SE 54 als geeignetste flüssige Phase. Mit SE 54 wurde die höchste Anzahl theoretischer Böden (94646) und die beste Auflösung der syn- anti-Isomeren der Oximderivate

erreicht (s. Tab. 10 Rs $^{syn}_{anti}$). Aus diesen Gründen wurden die gaschromatographischen Bestimmungen mit dieser Phase durchgeführt. Die Retentionscharakteristika, die sich für die Prostaglandine aus den Kovatsindices ergeben, befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die dieselben flüssigen Phasen benutzten (119,48).

4.5.2.5. Vergleich von Radioimmunassay und Gaschromatographie anhand der Bestimmung unbekannter Mengen von PGF_2

Um die Übereinstimmung der analytischen Methoden des Radioimmunoassays und der Gaschromatographie zu testen, wurden von einer dritten Person verschiedene PGF_2 -Lösungen (zwischen 1 ng und 100 ng/ml), die unabhängig voneinander gaschromatographisch (von mir) und radioimmunologisch (von Herrn Dr. Peskar, Pharm. Inst. Universität Freiburg) analysiert wurden. Die Ergebnisse aus beiden Bestimmungen waren in guter Übereinstimmung (Tab. 11).

Tabelle 11: Vergleich von RIA und GC (Wiederfindung $PGF_{2\alpha}$)

Eingewogenes $PGF_{2\alpha}$ (ng)	Wiedergefundenes $PGF_{2\alpha}$ (ng)	
	RIA	GC
2.8	2.6	2.7
7.6	7.3	7.1
16,0	16.0	19.7
28.0	26.4	23.5
36.0	34.5	28.4

4.5.2.6. Identifizierung der durch Lipopolysaccharid in Makrophagen induzierten Prostaglandine

Prostaglandine, die von Makrophagen (durch LPS induziert) gebildet werden, wurden in allen uns bekannten Veröffentlichungen seither mit Hilfe von Radioimmunassays (60,64,66) identifiziert und quantitativ bestimmt.

Bei diesen Methoden ist eine Unterscheidung zwischen PGE_1 und PGE_2 aufgrund der Kreuzreaktion jedoch nur in sehr beschränktem Umfang möglich. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen gaschromatographischen Methode ist eine solche Entscheidung klar zu treffen. Abb. 37 zeigt das Chromatogramm einer Probe, die aus Makrophagenüberständen gewonnen wurde. Die Bestimmung der Kovatsindices (3.16.6.) ergab, dass die Makrophagen bei LPS-Stimulation PGE_2 bildeten.

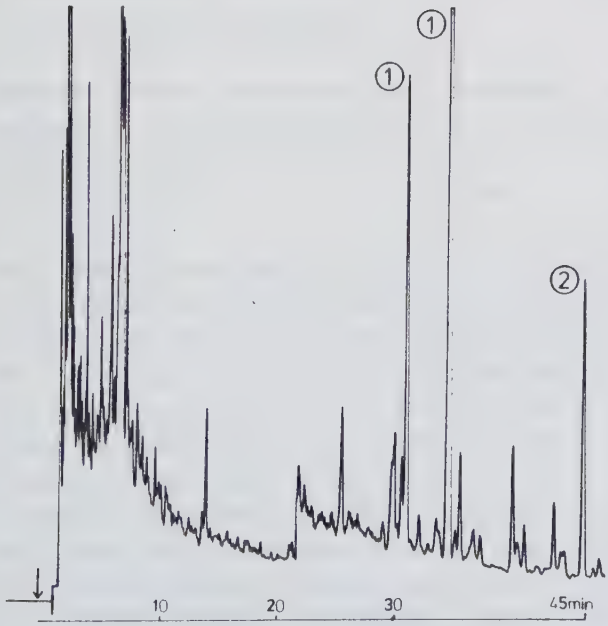


Abb. 37: Probe aus Makrophagenüberständen (1 = PGE_2, ME, BuOx, TMSi; 2 = interner Standard = Dotriacontan)

Makrophagen produzieren $PGF_{2\alpha}$, dies geht aus den ermittelten Kovatsindices hervor ($I^{SE\ 54}_{progr.}$: für Standard 2 768, für Probe aus Makrophagen 2770). Ein Gehalt an 6-ketoPGF$_1$, wie dies für zymosanstimulierte Makrophagen gefunden (16) wurde, konnte mit Hilfe der hier verwendeten Methode nicht detektiert werden.

4.6. Wirkungen von Prostaglandinen auf die Prostaglandinsynthese von Makrophagen

Es ist bekannt, dass Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) die bestimmten Stimuli ausgesetzt werden, Prostaglandine, besonders solche der E-Serie in vermehrtem Masse synthetisieren. Wie in den vorgehenden Kapiteln gezeigt wurde, gilt dies im Falle bakterieller Lipopolysaccharide besonders für Makrophagen.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Systemen beschrieben, wo gefunden wurde, dass Prostaglandine auf Zellen verschiedener Natur *in vitro* wirken. B-Zell Aktivität (Freisetzung von Antikörpern), die man in einem direktem hämolytischen Plaquetest nachweisen kann, wurde durch Zugabe von PGE$_2$ (E$_1$) signifikant gehemmt (120). Die mitogene Wirkung von Phythämaglutinin, welche für T-Zellen spezifisch ist, kann durch Zugabe von PGE$_2$ zu 50% unterdrückt werden (121).

T-Lymphozyten produzieren sog. Lymphokine, mittels derer sie die Aktivität von Makrophagen beeinflussen können, z.B. MIF (Migration Inhibitory Factor), welcher die Fortbewegung von Makrophagen unterbindet. Die MIF-Sekretion von Lymphozyten kann durch Prostaglandine vom E-Typ gehemmt werden und es wurde zwischen (MIF sezernierenden) T-Zellen und (PG-sezernierenden) Makrophagen ein Feed-back Mechanismus postuliert (112),welcher das Gleichgewicht der beiden Zellaktivitäten steuert. Prostaglandin E$_1$ bewirkt in Makrophagen eine Steigerung der Aktivität der Adenylcyclase (123). Ebenfalls wurde bei Prostaglandinzugabe eine Steigerung der LPS-induzierten Collagenase-Produktion von Makrophagen beobachtet (65).

Vor kurzem wurde in unserem Institut die Wirkung von Prostaglandinen auf morphologische Eigenschaften von Makrophagen und die Phagozytose von Zymosanpartikeln untersucht. Dabei wurden einschneidende strukturelle Veränderungen von PG-behandelten Makrophagen festgestellt (75). Prostaglandin-vorbehandelte Makrophagen wiesen überhaupt keine für aktive Makrophagen charakteristische Pseudopodien mehr auf. Diese Veränderungen sind durch Waschen der Zellen (Entfernen des Prostaglandins) revertierbar. Die Phagozytose von Zymosanpartikeln wurde unter dem Einfluss von PGE_1 um 70 % gehemmt, PGE_2 zeigte qualitativ und quantitativ dieselbe Wirkung. Es ist bisher nicht bekannt, ob exogene Prostaglandine auch einen Einfluss auf die Prostaglandinsynthese von Makrophagen haben.

4.6.1. Einfluss von Prostaglandinen auf die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen

Es wurde deshalb im Folgenden der Versuch unternommen, zu testen, ob die Inkubation von Makrophagen mit PGE_1 die LPS-induzierte Prostaglandinsynthese beeinflusste.

Die von Makrophagen in das umgebende Kulturmedium abgegebenen Mengen an PGE_2 liegen bei Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,2 nmol. Diese Lage schränkt die Möglichkeit zur Analyse ein. Sind solch grosse Mengen des zugesetzten PGE_1 (2,8 umol) neben den relativ geringen Mengen PGE_2 welches von Makrophagen produziert wird vorhanden, wird jeder Antikörper in einem Radioimmunassay der für PGE_2 spezifisch ist, mit dem in grossem Überschuss vorhandenen PGE_1 kreuzreagieren. Dies ist selbst bei strukturell weit weniger ähnlichen Molekülen der Fall. Es ist daher notwendig, andere anayltische Methoden einzusetzen, welche die Unterscheidung solch eng verwandter Moleküle ermöglichen. Die zur Zeit leistungsfähigste Methode für ein solches Problem stellt die Gaschromatographie mit Kapillarsäulen dar (s. 4.5.2.4. und 4.5.2.6.).

Überstände von Makrophagenkulturen, die mit Zymosan, Lipopolysaccharid und anderen Agenzien inkubierten, wurden in dem in (4.5.2.1.) zusammengefassten Verfahren aufgearbeitet. Nach der Vorreinigung der Proben über Sephadex LH-20 wurden die Methylester-Butyloxim-Trimethylsilylderivate der Proben hergestellt. Nach Zugabe eines internen Standards wurde der Prostaglandingehalt der einzelnen Proben gaschromatographisch bestimmt.

Tabelle 12: LPS-induzierte PG-Synthese in Gegenwart von Prostaglandinen (1)

Nr.	Inkubation	Gebildetes PGE_2 (ng/ml)	Gebildetes $6kF_{1\alpha}$ (ng/ml)
1	Makrophagen	13,8	-
2	Makrophagen LPS	56,7	-
3	Makrophagen LPS PGE_1	56,1	-
4	Makrophagen LPS Arachidonsre.	87,3	-
5	Makrophagen LPS Arachidonsre. PGE_1	96,2	-
6	Makrophagen LPS $PGF_{2\alpha}$	68,7	-

(1) Die Mengen von $PGF_{2\alpha}$ bewegten sich an der untersten Grenze der Detektierbarkeit oder konnten nicht erfasst werden. Sie sind aus diesem Grund nicht in der Tabelle aufgeführt.

Makrophagen (9×10^7 in 60 ml Medium) wurden mit PGE_1 (1 ug/ml = $2{,}8 \times 10^{-6}$M) für eine Stunde vorbehandelt und dann in Gegenwart von LPS (10 ug/ml mRe ED TEA) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Menge der gebildeten Prostaglandine wurde gaschromatographisch (s. 2.3.) bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tab. 11 festgehalten.

Aus Tabelle 12 geht hervor:

- Durch die Behandlung der Makrophagen mit LPS wurde eine Stimulation der Synthese von PGE_2 um das Vierfache erreicht (Nr. 1,2)

- Die LPS-induzierte Synthese von PGE_2 wurde durch die Zugabe von PGE_1 nicht beeinflusst (Nr. 3)

- Zugabe von Arachidonsäure führte zu einer Stimulation der LPS-induzierten Synthese von PGE_2 (Nr. 4)

- Die durch Arachidonsäure verursachte Steigerung wurde durch Zugabe von PGE_1 leicht stimuliert (Nr. 5)

- Die Zugabe von $PGF_{2\alpha}$ hatte einen leicht steigernden Effekt auf die Synthese von PGE_2

Diese Ergebnisse lassen sie wie folgt zusammenfassen:

* Die LPS-induzierte endogene Synthese von PGE_2 war durch Zugabe von exogenem PGE_1 nicht beeinflussbar.

* Die Synthese von PGE_2 wurde durch Zugabe von Arachidonsäure gesteigert.

* Es wurden keine erfassbaren Mengen an PGI_2 (6-k$PGF_{1\alpha}$) synthetisiert.

4.6.2. Einfluss von Prostaglandinen auf die Zymosan-induzierte Prostaglandinsynthese von Makrophagen

Im folgenden werden Versuche beschrieben, welche die Wirkung von PGE_1 auf die Zymosan-induzierte Prostaglandinsynthese untersuchen.

Tabelle 13: Zymosan-induzierte PG-Synthese in Gegenwart von Prostaglandinen

Nr.	Inkubation	Gebildetes PGE_2 (ng/ml)	Gebildetes $PGF_{2\alpha}$ (ng/ml)	Gebildetes $6kF_{1\alpha}$ (ng/ml)
1	Makrophagen	6,7	-	-
2	Makrophagen Zymosan	51,4	4,0	-
3	Makrophagen Zymosan PGE_1	40,8	3,5	3,7
4	Makrophagen Zymosan Arachidonsre.	65,0	4,1	-
5	Makrophagen Zymosan Arachidonsre. PGE_1	52,6	3,6	-
6	Makrophagen Zymosan Arachidonsre. $PGF_{2\alpha}$	49,6	*	-
7	Makrophagen Zymosan Palmitinsre. PGE_1	50,8	3,9	-

* konnte aufgrund der Zugabe exogenen $PGF_{2\alpha}$ nicht bestimmt werden

\- unter der Detektionsgrenze

Makrophagen (9×10^7 Zellen pro 60 ml) wurden gleichzeitig mit PGE_1, $PGF_{2\alpha}$, Arachidonsäure, Palmitinsäure (1 ug/ml) und Zymosan (500 ug/ml) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und der Gehalt an Prostaglandinen im Überstand wurde gaschromatographisch bestimmt. Das Resultat dieser Versuche ist in Tabelle 13 festgehalten.

Aus Tabelle 13 geht hervor:

- Es war eine gute (8-fache) Stimulation der Synthese von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ zuerkennen (Nr. 1,2).

- Durch die Zugabe von PGE_1 konnte die Synthese von PGI_2 (6-k$PGF_{1\alpha}$) induziert werden (Nr. 3).

- Die Zymosaninduzierte Synthese von PGE_2 wurde durch die Zugabe von PGE_1 um 21 % gehemmt (Nr. 3). Die Synthese von $PGF_{2\alpha}$ schien dadurch unbeeinflusst zu bleiben (Nr. 3). $PGF_{2\alpha}$ war in dieser Hinsicht nicht aktiv (Nr. 7).

- Die Hemmung der Synthese von PGE_2 durch PGE_1 wurde durch Zugabe von Arachidonsäure und Palmitinsäure überspielt (Nr. 5,7).

- Inkubation mit Arachidonsäure führte zu einer Steigerung der Synthese von PGE_2 (Nr. 4).

Da sich eine Wirkung von PGE_1 auf die Zymosan-induzierte Synthese von PGF_2 bzw. die Synthese von PGI_2 andeutete, wurde der Versuch wiederholt, indem die Makrophagen vor der Zugabe von Zymosan mit PGE_1 und den anderen zu testenden Substanzen für 1 Stunde bei 37°C vorinkubiert wurden. Nach der Inkubation mit Zymosan wurden die Zellüberstände aufgearbeitet und mit Hilfe der Gaschromatographie analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 festgehalten. Es zeigte sich für die Synthese von PGF_2 dieselbe Tendenz wie ohne Vorinkubation, diese erzielten Effekte traten jedoch deutlicher hervor.

Tabelle 14: Zymosan-induzierte PG-Synthese in Gegenwart von Prostaglandinen nach Vorinkubation

Nr.	Inkubation	Gebildetes PGE_2 (ng/ml)	Gebildetes $PGF_{2\alpha}$ (ng/ml)	Gebildetes $6kF_{1\alpha}$ (ng/ml)
1	Makrophagen	8,7	2,9	-
2	Makrophagen Zymosan	64,0	5,0	13,0
3	Makrophagen Zymosan PGE_1	25,8	7,1	58,6
4	Makrophagen Zymosan Arachidonsre.	86,3	6,6	21,4
5	Makrophagen Zymosan Arachidonsre. PGE_1	68,0	5,8	38,8
6	Makrophagen Zymosan $PGF_{2\alpha}$	68,7	*	29,3
7	Makrophagen Zymosan Palmitinsre. PGE_1	70,4	4,6	6,1

* konnte aufgrund der Zugabe exogenen $PGF_{2\alpha}$ nicht bestimmt werden.

- unter der Detektionsgrenze

Aus Tabelle 14 geht hervor:

- Es war wiederum eine gute Stimulation der Synthese von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ zu erkennen (Nr. 1,2).

- Die Synthese von PGI_2 konnte nachgewiesen werden (Nr. 2-7).

- Die Zymosan-induzierte Synthese von Prostaglandin E_2 wurde durch Zugabe von PGE_1 um mehr als 50% gehemmt (Nr. 3). $PGF_{2\alpha}$ war in diesem Sinne nicht aktiv (Nr. 6).

- Die Zymosaninduzierte Synthese von PGI_2 (6k$PGF_{1\alpha}$) wurde durch Zugabe von PGE_1 um mehr als 400% gesteigert (Nr. 3). Durch Zugabe von $PGF_{2\alpha}$ wurde eine Steigerung von 100% erreicht (Nr. 6).

- Die Hemmung der Synthese von PGE_2 wurde durch Zugabe von Arachidonsäure und Palmitinsäure vollständig überspielt (Nr. 5,7).

- Inkubation mit Arachidonsäure führte zu einer Steigerung der Synthese von PGE_2 um 26% und der Synthese von PGI_2 (6k$PGF_{1\alpha}$) um 62% (Nr. 4). Zugabe von PGE_1 resultierte in einer Hemmung der Synthese von PGE_2 um 21%, womit die Menge erreicht ist, welche bei blosser Zymosanzugabe produziert wurde (Nr. 5). Durch Zugabe von PGE_1 wurde die Synthese von PGI_2 um 180% gesteigert (Nr. 5).

- Durch Inkubation der Makrophagen mit PGE_1 und Palmitinsäure wurde die Hemmung der Synthese von PGE_2 vollständig aufgehoben, während die Steigerung der Synthese von PGI_2 (6k$PGF_{1\alpha}$) die mit PGE_1 erreicht wurde, mit Palmitinsäure total unterdrückt werden konnte (Nr. 7).

Diese Versuche zeigen, dass exogenes PGE_1 einen dramatischen Einfluss auf die Prostaglandinsynthese von Makrophagen ausübt. Weiterhin deuten diese Versuche an, dass Agenzien wie etwa PGE_1, die die Zymosan-induzierte PGE_2-Synthese hemmen, die Synthese von PGI_2 steigern. Darüberhinaus wird

mit Substanzen, welche die Hemmung der Synthese von PGE_2 aufheben die Produktion von PGI_2 gesenkt.

4.7. Wirkung von PGE_1 (E_2) auf die Phagozytose von Zymosanpartikeln

Nachdem gezeigt war, dass exogenes Prostaglandin E_1 einen nachhaltigen Einfluss auf die Prostaglandinsynthese von Makrophagen nimmt, wurde in einer letzten Versuchsreihe der Einfluss von exogenem PGE_2 auf die Phagozytosekapazität von Peritonealmakrophagen getestet. Wie in (4.6.) eingangs erwähnt, haben beide (PGE_1 und E_2) eine hemmende Wirkung auf die Phagozytose von Zymosanpartikeln (4.6.)

Die Zellen (2×10^5/2 ml) wurde mit PGE_2, und Arachidonsäure (1 ug/ml) für 1 Stunde vorbehandelt und dann mit Zymosan (30 min., 37^oC) inkubiert. Nach dem Abwaschen des nicht phagozytierten Zymosans wurden die Zellen in Methanol fixiert, und die sie tragenden Deckgläschen auf Objektträger aufgeklebt. Diese Dauerpräparate wurden unter dem Mikroskop wie unter 2.12. beschrieben ausgezählt.

Es zeigte sich, dass PGE_2 die Phagozytosekapazität von Peritonealmakrophagen gegenüber Zymosanpartikeln drastisch hemmte (Abb. 38. Zymosan, PGE_2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Phagozytose mit Arachidonsäure aufgehoben werden konnte (Abb. 38, Zymosan, PGE_2, 20:4). Damit weisen diese Versuche einige Übereinstimmungen zu den unter (3.4.2.) beschriebenen Versuchen auf.

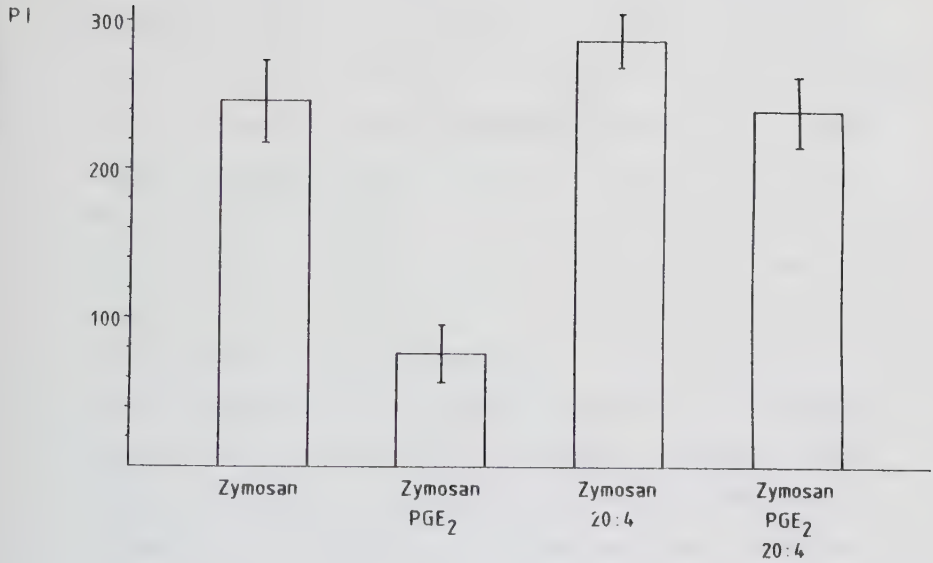


Abb. 38: Der Einfluss von PGE_2 und Arachidonsäure auf die Phagozytose von Zymosanpartikeln.

PI: Phagozytose Index $= \frac{PZ \times PP}{GZ}$

PZ: Anzahl der phagozytierenden Zellen

PP: Anzahl der phagozytierten Partikel

GZ: Anzahl der ausgezählten Zellen

20:4: Arachidonsäure

Einerseits wurde durch die Zugabe von $PGE_{(1,2)}$ die Phagozytose gehemmt; dieselbe Behandlung führte zu einer Steigerung der Synthese von PGI_2. Andererseits konnte durch Zugabe von Arachidonsäure die Hemmung der Phagozytose aufgehoben werden; diese Behandlung führte dazu, dass die Synthese von PGI_2 absank.

5. DISKUSSION

Makrophagen wurden mit Prostaglandinen zum erstenmal bei der Untersuchung chronischer Entzündungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht (8). Das persistierende Zellinfiltrat aktiver Läsionen besteht zum grössten Teil aus mononuklearen Zellen und enthält zwei Zelltypen, Makrophagen und Lymphoyzten. Die Entzündung wird neben der cytotoxischen Aktivität der Zellen hauptsächlich durch lösliche Mediatoren hervorgerufen, die von Makrophagen bzw. Lymphozyten produziert werden und von denen Lymphokine, lysosomale Enzyme und Prostaglandine die wichtigsten sind. Durch in vitro Versuche mit isolierten und gereinigten Zellen schälte sich ein Modell heraus, die sogenannte "Lymphozyten-Makrophagenachse" (122). Der Lymphozyt bewirkt dabei durch Sekretion von Lymphokinen die Aktivierung des Makrophagen, was diesen zur erhöhten Sekretion lysosomaler Enzyme und von Prostaglandinen anregt. Diese Produkte des aktivierten Makrophagen, insbesondere die Prostaglandine, wirken sich hemmend auf die Lymphokinsynthese seitens der Lymphozyten aus. Ist dieser Feed-back-Mechanismus gestört, so führt die ununterbrochene Sekretion von Prostaglandinen und lysosomalen Enzymen zu Gewebsläsionen und schliesslich zu einer chronischen Entzündung.

Einen weiteren Hinweis auf Makrophagen als Prostaglandinquelle gab die Feststellung, dass Zellablagerungen an intrauterinen Contraceptiva aus aktivierten Makrophagen und Neutrophilen bestehen. Im venösen Blut des Uterus findet man in solchen Fällen erhöhte Prostaglandinspiegel, die man den Makrophagen der Zellablagerungen zuschreibt. Es wurde vermutet, dass die Wirkung dieser Contraceptiva durch die Prostaglandinsekretion der aktivierten Makrophagen zustande kommt (125).

Erste, definitive Hinweise auf regulatorische Wirkungen der von Makrophagen produzierten Prostaglandine erhielt man aus in vitro Versuchen zur Zell-Zell Interaktion von B-Lymphozyten und Makrophagen. Stoffe, die reine B-Lymphozyten zur Proliferation anregen können, nennt man B-Zell Mitogene (126), im Gegensatz zu Antigenen, mit denen eine B-Zellstimulierung nur in Gegenwart bestimmter Thymuszellen (T-Helferzellen) und Makrophagen gelingt (127). Ein solches B-Zell Mitogen ist z.B. Endotoxin. Inkubiert man B-Lymphozyten in einer Agarkultur mit LPS, so proliferieren die Zellen und bilden Klone. Werden zusätzlich in diesen Kulturen Makrophagen inkubiert, so wird die mitogene Wirkung des LPS auf die Lymphozyten durch ein Makrophagenprodukt unterdrückt, welches durch Endotoxineinwirkung entsteht (128). Einen deutlichen Hinweis auf eine Prostaglandinaktivität in diesem Versuch gab das folgende Experiment: inkubierte man mit Indomethacin, wodurch die Prostaglandinsynthese der Makrophagen gehemmt wurde, konnte die Suprimierung der B-Zell-Mitogenität aufgehoben werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass reine Makrophagenkulturen (Knochenmarkkulturen) durch LPS zu erhöhter Synthese der Prostaglandine E_2 und $F_{2\alpha}$ angeregt werden können. Dieses stellt einen eindeutigen Hinweis auf Makrophagen als Quelle LPS-induzierter Prostaglandinsynthese dar (129). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Prinzip, das für die Prostaglandin induzierte Aktivität des LPS verantwortlich ist, im Lipidteil des Moleküls (Lipoid A) liegt. Arbeiten von Kurland et al. (128) die mit Makrophagenzellinien durchgeführt wurden, kamen zu demselben Ergebnis.

Der durch Endotoxin in Makrophagen verursachte Anstieg in der Synthese von Prostaglandinen ist abhängig von der Dosis des eingesetzten Lipopolysaccharids, der Inkubationsdauer und der Anzahl der Zellen. Es zeigten sich in

diesem Zusammenhang Unterschiede zwischen Makrophagen aus Knochenmarkkulturen und Peritonealzellen. Nach drei Stunden konnte bei Peritonealmakrophagen, nicht aber bei Knochenmarkzellen ein deutlicher Anstieg beobachtet werden. Bei Peritonealzellen wurde bei einer hohen Anzahl der eingesetzten Zellen eine Selbstaktivierung vermerkt, welche nur noch zu einem geringen Prozentsatz mit LPS gesteigert werden konnte (s. 4.1.1.2. und 4.1.2.).

Die Resultate, die sich bei Peritonealmakrophagen ergaben, decken sich mit der bei Knochenmarkmakrophagen gewonnenen Erkenntnis, dass die Induktion der Prostaglandinsynthese vom Lipoid A ausgeht. Reines Lipoid A ist bei guter Löslichkeit, z.B. als LA-BSA oder als LA-TEA vollständig aktiv (4.1.2.7.). Chemische Modifikationen des Lipoid A, die eine Veränderung seiner endotoxischen Aktivität bewirken, setzen seine Fähigkeit zur Aktivierung der Prostaglandinsynthese drastisch herab (s. Tabelle 4). Es handelt sich dabei durchweg um Derivate, bei denen entweder die Fettsäuren des Lipidteiles abgespalten sind oder wie im Falle des Phtalylderivates polare Gruppen eingeführt wurden. In allen diesen Fällen wird der lipophile Charakter des Lipoid A stark herabgesetzt. Gerade diese Eigenschaft ermöglicht es aber den Lipopolysacchariden im nativen Zustand mit Membranen zu interagieren.

Erste Hinweise darauf erhielt man durch Bindungsstudien an Erythrozyten (130). Dabei wurde gefunden, dass lipidfreies Polysaccharid aus LPS nicht an Erythrozytenoberflächen angeheftet wurde. Wurden jedoch O-Stearoylderivate des Polysaccharids in solchen Tests eingesetzt, konnte man bereits eine gute Affinität zur Erythrozytenoberfläche feststellen. Essentiell für das Anhaften des LPS ist also sein Lipidteil.

Versuche, die mit künstlichen Membranen durchgeführt wurden, zeigten, dass bakterielle Lipopolysaccharide in Lipidmonolayer und Bilayer eindringen

können (131). Die Stabilität solcher Bilayer wurde in Gegenwart von LPS herabgesetzt (132). LPS, aus dem durch alkalische Behandlung Fettsäuren entfernt worden waren, zeigte überhaupt keinen Effekt auf die Bilayer.

Werden Liposomen in Gegenwart von Glucose hergestellt, so können sie diese bei ihrer Bildung einfangen. Wenn solche Mycellen lysiert werden, kann man den Grad der Lyse an der ausgeströmten Glucose messen. Kotaka und Mitarbeiter (133) stellten solche Liposomen in Gegenwart von Salmonella Lipopolysacchariden her. Wurde zu den entstandenen Liposomen ein LPS-Antiserum und Komplement gegeben, so trat Immunlyse ein. Da Komplement nur im Fall der Bindung des Antikörpers an das Antigen aktiviert werden kann, war damit bewiesen, dass der immundeterminante Teil des Lipopolysaccharids (welcher durch den Polysaccharidteil repräsentiert wird) für den Antikörper zugänglich war und sich folglich ausserhalb des Liposoms befunden haben musste. Das LPS wurde nicht einfach von den Liposomen eingefangen, sondern in einer eindeutigen Orientierung in die Lipidschicht eingebaut, wobei der immundeterminante Polysaccharidteil nach aussen gerichtet war.

Der Einbau von Lipopolysacchariden in Liposomen illustriert die Art der Wechselwirkungen die wahrscheinlich für LPS und Biomembranen gelten: alle Fakten sprechen für eine Lipid-Lipid Anziehung zwischen den Membranlipiden und dem Lipoid A des LPS. Nach Befunden von Romeo et al. (134) werden dabei bestimmte Phospholipide bevorzugt.

In Erythrozyten und Granulozyten wurden rezeptorähnliche Moleküle mit hoher Affinität für LPS isoliert (135,136). Im Falle der Erythrozyten handelt es sich um ein Lipoglycoprotein, bei den Granulozyten um ein Makromolekül mit Lipidnatur.

Wie Versuche von Davis et al. (137) über Absorption und Desorption radioaktiv markierten LPS von Erythrozyten, Human-Leukozyten und Mausmakro-

phagen nahelegen, besteht die Wirkung von LPS wahrscheinlich darin, die Symmetrie der Membran zu verändern.

Das von Davis et al. verwendete LPS war von uneinheitlicher Zusammensetzung und bestand aus drei Fraktionen: LPS I (Lipidhaltig), LPS II (Lipid- und Polysaccharidhaltig), und LPS III (Polysaccharidhaltig). Bei der Inkubation des LPS mit Zellen beobachteten sie ein zyklisch sich wiederholendes Ansteigen bzw. Abklingen der an die Zellen gebundenen Radioaktivität. Die Erklärung der Autoren ist folgende: LPS I und II werden von der Zellmembran durch Lipid-Lipidwechselwirkungen fest gebunden. LPS III kann nur über elektrische Coulombkräfte locker an die Oberfläche geheftet werden. Die im Inneren der Membran durch den Lipidanteil des LPS verursachten Veränderungen ziehen eine Ladungsänderung auf der Membran nach sich, welche in einer Desorption des angehefteten Polysaccharids resultiert, wobei LPS I und II angeheftet bleiben, was sich in den Veränderungen äussert, die zu einer erneuten Absorption von LPS III führen.

Die durch LPS induzierte Prostaglandinsynthese weist alle Parallelen zu den pathophysiologischen Wirkungen von LPS in Tieren auf. Nur solche LPS-Formen, welche endotoxisch aktiv sind leiten eine Prostaglandinsynthese in Makrophagen ein. Dies sind ausschliesslich solche, die ein intaktes Lipoid A aufweisen. Chemisch modifiziertes LPS, das z.B. keine Fettsäuren im Lipidteil mehr besitzt, kann nicht in die Membran penetrieren, und deren Struktur bleibt somit unbeeinflusst.

Phtalyliertes LPS zum Beispiel hat einen Teil seiner Lipideigenschaften dadurch verloren, dass Carboxylgruppen in das Molekül eingeführt wurden. Darüber hinaus dürfte seine sterische Konfiguration zu jener von unverändertem LPS Unterschiede aufweisen. Es ist leicht denkbar, dass solcherart verändertes LPS z.B. nicht soweit in die Membran eintauchen kann und damit keine Veränderungen bewirkt, die eine Aktivierung der Prostaglandinsynthese

nach sich ziehen.

Die unter 4.1.2.8. beschriebenen Versuche beweisen, dass der limitierende Schritt der Prostaglandinsynthese in Makrophagen in der Bereitstellung der Arachidonsäure als Substrat liegt. Sie zeigen damit deutlich die Abhängigkeit der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese von der Aktivität der Phospholipase A_2, wie sie auch für andere Systeme gezeigt werden konnte (14,15). Wurde diese "Kontrollschranke" durch Zugabe externer Arachidonsäure umgangen, konnte ohne andere Stimuli eine erhöhte Prostaglandinsynthese gemessen werden. Die Prostaglandin induzierende Wirkung des LPS wird demnach durch eine Aktivierung des Membranenzyms Phospholipase A_2 eingeleitet.

Die Versuche, die unter 4.2. dargestellt sind, zeigen, dass LPS im Gegensatz zu Zymosan die Sekretion des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase nicht stimuliert und sind ein Hinweis darauf, dass LPS nicht durch Makrophagen phagozytiert wird. Die Rolle dieser Zelle bei LPS-Effekten bestünde demnach nicht in erster Linie in der Aufnahme und Entgiftung des Endotoxins, wie dies lange Zeit angenommen wurde (56). Vielmehr liegt nahe, dass LPS seine Wirkungen über eine Interaktion mit der Zellmembran entfaltet und auf diese Weise den Makrophagen zur Sekretion von Mediatoren anregt, welche ihrerseits auf andere Gewebe und Zellen wirken können. In letzter Zeit wurden immer mehr solcher Mediatoren die durch LPS in Makrophagen induziert werden identifiziert (s.1.5.).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, induziert LPS allein in Makrophagen, nicht aber in Granulozyten oder Milzzellen eine erhöhte Synthese von Prostaglandinen, deren Mediatorfunktion für verschiedene LPS-Phänomene (s.1.4.) nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus induzieren alle endotoxisch aktiven Lipopolysaccharide in Makrophagen <u>in vitro</u> erhöhte Prostaglandinsynthese und damit die Mediatoren, welche <u>in vivo</u> LPS-Wirkungen wie

Fieber, Abort und Letalität vermitteln. Dagegen waren in vivo endotoxisch unwirksame Lipopolysaccharide nicht in der Lage, in vitro die Prostaglandinsynthese von Makrophagen zu stimulieren. Die Untersuchung von Makrophagen aus Endotoxin-unempfindlichen Mäusen (C3H/HeJ) zeigte, dass diese Zellen nicht mit LPS zur Synthese von Prostaglandinen angeregt werden können (4.1.2.6.). Diese eindeutige Korrelation zwischen Prostaglandinsynthese und LPS-Unempfindlichkeit stellt ein gutes Indiz für die Hyphothese dar, dass Makrophagen durch Produktion von Prostaglandinen für die Vermittlung gewisser LPS-Effekte verantwortlich sind.

Diese Vorstellung wird gestützt durch die Versuche die mit Makrophagen aus toleranten und hyperreaktiven Mäusen durchgeführt wurden (4.4.). In der LPS-induzierten Prostaglandinsynthese der Makrophagen spiegelten sich sowohl Toleranz, als auch Hyperreaktivität der Mäuse wider. Damit wurde die LPS-Toleranz auf zellulärer Ebene nachgewiesen. Der tolerante Zustand der Tiere korrelierte mit erniedrigter Prostaglandinsynthese während der hyperreaktive Zustand der Tiere mit erhöhter Prostaglandinsynthese einherging.

Makrophagen aus toleranten Tieren zeigten neben der erniedrigten Prostaglandinsynthese noch andere Eigenschaften, die denen der Makrophagen aus C3H/HeJ Mäusen sehr ähnlich sind: Unempfindlichkeit gegenüber cytolytischen Wirkungen von LPS, Induzierbarkeit der Prostaglandinsynthese durch andere Stimuli wie etwa Zymosan (C3H/HeJ-Makrophagen können mit bakteriellen Proteinen die kein LPS enthalten zur PG-Synthese stimuliert werden (71)). Weiterhin konnte sowohl in Makrophagen aus toleranten (4.4.3.) als auch in solchen aus C3H/HeJ Mäusen (117), die Synthese von Prostaglandinen durch Medien welche CSF (colony stimulating Factor) enthalten, stimuliert werden. Durch die Versuche (4.4.5.) zur Phagozytosekapazität toleranter Makrophagen wurde gezeigt, dass die Zellen voll funktionsfähig sind.

Die Induzierbarkeit der Prostaglandinsynthese von Makrophagen durch LPS ist

demnach eng verbunden mit der LPS-Unempfindlichkeit von C3H/HeJ Mäusen und der Toleranz bzw. Hyperreaktivität LPS-sensibler NMRI Mäuse.

Wie die durch die Einwirkung von LPS in Makrophagen gebildeten Prostaglandine die letale Wirkung in Tieren auslösen ist unbekannt. Es ist unwahrscheinlich, dass sie direkte toxische Effekte haben. Denkt man aber an die hemmenden Einflüsse, welche Makrophagen via PGE z.B., auf B-Lymphozyten haben, oder an den nachhaltigen Einfluss, den Prostaglandine über die Aktivierung der Adenylcyclase auf eine Vielzahl von Stoffwechselwegen ausüben können oder ihre vasodilatorischen und -konstriktorischen Wirkungen und zieht man andererseits in Betracht, dass Makrophagen nahezu alle Organe und Gewebe eines Organismus besiedeln (Kupfferzellen in der Leben, Alveolarmakrophagen in der Lunge usw.) kommt ihrer LPS-vermittelten Prostaglandinsynthese ausserordentliche Bedeutung zu.

Bei der Untersuchung der Prostaglandinsynthese von Makrophagen sollte die Wirkung berücksichtigt werden, die Prostaglandine über spezifische Rezeptoren ausüben, die bei Makrophagen nachgewiesen werden (11). Prostaglandine entfalten eine Reihe ihrer biologischen Aktivitäten, indem sie an diese Rezeptoren binden, was in der Folge die Stimulation des membrangebundenen Enzyms Adenylcyclase nach sich zieht und dazu führt, dass vermehrt cyclo-AMP gebildet wird, welches seinerseits zur Gewebe- und Zellspezifischen Aktivierung bzw. Hemmung von Stoffwechselwegen führt (138,118).

Die Kontrolle des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Prostaglandine ist besonders gut in Thrombozyten untersucht worden.

1975 entdeckten Hamberg et al. (140) eine neue Gruppe biologisch aktiver Verbindungen, die wie die Prostaglandine aus Arachidonsäure gebildet werden und die sie Thromboxane nannten. Der Name stammt daher, dass diese Verbindungen in Thrombozyten gefunden wurden und einen Oxanring im

Molekül tragen. Die Thromboxanbildung ist der Hauptweg des Arachidonsäuremetabolismus in Blutplättchen. Thromboxan A_2 verursacht in hohem Masse die Aggregation der Blutplättchen und hat vasokonstriktorische Wirkung.

Bei Untersuchungen von Gefässendothelzellen wurde deren Fähigkeit Endoperoxide in Prostacyclin (PGI_2) umzuwandeln entdeckt (141,142). Es stellte sich heraus, dass Prostacyclin genau die entgegengesetzte Wirkung von Thromboxan entfaltet. Es wirkt vasodilatorisch und ist der bislang stärkste Inhibitor der Thrombozytenaggregation.

Vom Wirkungsmechanismus dieser beiden Gegenspieler geben Nalbandian et al. (13) folgendes Bild:

Die von Thromboxan A_2 induzierte Blutplättchenaggregation kommt dadurch zustande, dass TxA_2 Ca^{++}-Ionen, die im dichten tubulären System der Thrombozyten gespeichert sind, mobilisiert und gleichzeitig die Adenylcyclase hemmt. Es wird weniger cAMP gebildet und Calcium wird freigesetzt. Das Resultat ist die Einleitung der Aggregation.

Prostacyclin hingegen, welches in den Endothelzellen der Gefässe gebildet wird, veranlasst eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Thrombozyten durch Aktivierung der Adenylcyclase. Ein cAMP abhängiges Protein produziert eine Phosphokinase, welche ihrerseits die Bildung von Chelatkomplexen mit Ca^{++} fördert. Dieses Calcium ist nicht aktiv, die Thrombozytenaggregation ist gehemmt. Ausserdem wird durch cAMP die Aktivität der Phospholipase A_2 gehemmt, welche im übrigen Ca-abhängig ist, sodass die Bildung von TxA_2 unterbrochen wird. Tatsächlich kann die Aggregation durch Zugabe von cAMP gehemmt werden, die Hemmung wird durch Zugabe eines Überschusses an Calcium rückgängig gemacht.

Allgemein ausgedrückt bedeutet dies: Substanzen, welche die Thrombozytenaggregation hemmen, erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel, Substanzen,

welche die Aggregation induzieren, führen zur Erniedrigung der Bildung von cAMP in der Zelle. Es erscheint deshalb sinnvoll, dem cAMP in Bezug auf die Thrombozytenaggregation zwei Wirkungen definitv zuzuschreiben: es reguliert den intrazellulären Calciumspiegel und kontrolliert (hemmt) die Phospholipase A_2.

In der Aktivierung der Adenylcyclase erweist sich PGI_2 weitaus wirkungsvoller als andere Prostaglandine. Bei PGD_2 und$PGE_{1(2)}$ ist jedoch eine in dieser Richtung deutliche Aktivität erkennbar.

Im Säugetierorganismus wäre somit ein sehr feiner Regulationsmechanismus gefunden, um die Blutplättchenaggregation bei Verletzungen usw. schnell zu aktivieren, indem die PGI_2 Produktion des Gefässendothels unterdrückt wird. Somit käme nur noch die aggregierende und vasokonstringierende Wirkung des Thromboxans zum Tragen. Unter normalen physiologischen Bedingungen unterdrückt der ständige Einfluss von PGI_2 die Thrombozytenaggregation und damit auch die Thrombenbildung.

Bei Makrophagen sind solche intrazellulären Kontrollmechanismen weit weniger untersucht. Im Hinblick auf die Wirkungen der Prostaglandine weiss man jedoch, dass $PGE_{1(2)}$ drastische morphologische (75) und funktionelle Veränderungen hervorruft. Dies geht auch aus den Versuchen (4.7.) hervor, wo gezeigt wird, dass die Phagozytose durch PGE_2 nachhaltig unterdrückt werden kann.

Gemsa et al. konnten 1975 (143) zeigen, dass Makrophagen erhöhte Mengen cAMP produzieren, wenn sie mit Prostaglandinen, besonders solchen der E-Serie behandelt werden. Zieht man den Vergleich mit Thrombozyten, so sollte bei einer Erhöhung des cAMP auch die Phospholipase A_2 im Makrophagen gehemmt sein. Wenn die Wirkung des Prostaglandins E_1 darin bestünde, den Gehalt an cAMP zu erhöhen, und die Phospholipase A_2 zu hemmen, müsste die durch LPS-induzierte Prostaglandinsynthese z.B. von

PGE_2 gehemmt werden oder ganz unterbrochen sein, da diese von der Versorgung mit Substrat durch die PLA_2 abhängig ist; darüber hinaus müsste diese Hemmung durch Zugabe von Arachidonsäure durchbrochen werden können. Damit lag die Versuchsanordnung auf der Hand, wie sie in 4.6.1. dargestellt ist. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass im Fall der LPS-stimulierten PG-Synthese die Phospholipase A_2 durch PGE_1 oder dadurch induziertes cAMP nicht gehemmt wurde, denn die Produktion von PGE_2 wurde durch Zugabe von PGE_1 nicht gehemmt.

Der Versuch zeigt ausserdem, dass die Phospholipase nicht die zur Substratsättigung benötigten Mengen an Arachidonsäure zur Verfügung stellt, da Substratzugabe durch externe Arachidonsäure zu einer Steigerung in der Synthese von PGE_2 um 54 % führt. Bei dieser Versuchsanordnung wurden ausser der Prostaglandinsynthese keine anderen Parameter gemessen, die eine Wirkung von PGE_1 auf die Zelle sichtbar machen würden.

In den Versuchen, die unter (4.7.) dargestellt sind, wurde die Wirkung von PGE_2 auf die Phagozytose von Zymosanpartikeln untersucht. Man konnte eine deutliche Hemmung der Aufnahme von Partikeln feststellen, welche durch die Zugabe von Arachidonsäure aufgehoben werden konnte. Dieser Befund legte eine regulierende Beteiligung der Phospholipase A_2 in der Aufnahme von Zymosanpartikeln nahe, welche durch PGE_1 bzw. cAMP gehemmt wäre. Im Fall der Zugabe von Arachidonsäure würde dieser Block umgangen und die normale Zellfunktion wieder hergestellt.

Die Versuche, welche unter (4.6.2.) dargestellt sind, zeigen, dass eine solche Regulation (Hemmung der PLA_2) nicht vorliegen kann. Mit der Hemmung der Synthese von PGE_2 durch Zugabe von PGE_1 geht ein starker Anstieg der Synthese von PGI_2 einher. Eine Hemmung der PLA_2 müsste jedoch die gesamte Prostaglandinsynthese unterbinden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die durch PGE_1 verursachte Hemmung der Phagozytose nicht auf

der Ebene der Phospholipase A_2 zu suchen ist.

Die Vermutung wird besonders durch die Beobachtung gestützt, dass die Hemmung der Synthese von PGE_2 die durch PGE_1 hervorgerufen wurde mit Palmitinsäure - also keiner Vorstufe für Prostaglandine - durchbrochen werden konnte, wobei gleichzeitig die Produktion von PGI_2 absank.

PGE_1 könnte vielmehr an der PGE_2-Isomerase - welche die Umwandlung von PGH_2 in PGE_2 katalysiert - und (oder) an der Prostacyclinsynthese - Umwandlung von PGH_2 zu PGI_2 - regulierend in die Prostaglandinsynthese eingreifen. Dass es sich dabei nicht um eine einfache Endprodukthemmung der PGE_2-Isomerase handelt, wird durch die Versuche bewiesen, bei denen LPS eingesetzt wurde: PGE_1 hatte keinen hemmenden Einfluss. Die einfachste Erklärung dafür könnte eventuell darin zu sehen sein, dass PGE_1 in das Zellinnere gelangen muss um seine hemmende Wirkung zu entfalten. Dies ist bei der Phagozytose von Zymosan aber in weit grösserem Masse der Fall, als bei der Wirkung von LPS auf die Zellen, bei der es sich nicht um Phagozytose zu handeln scheint (4.2.).

Bei der Hemmung der Phagozytose von Zymosanpartikeln mit PGE_1 könnte die Synthese von Prostacyclin eine bedeutende Funktion haben. Durch Behandlung der Makrophagen mit PGE_1 wird vermehrt Prostacyclin gebildet, die Fähigkeit zur Aufnahme von Zymosanpartikeln sinkt. Wird jedoch die Synthese von Prostacyclin z.B. durch Arachidonäsure oder Palmitinsäure unterdrückt, so wird, zumindest im Fall der Arachidonsäure die Fähigkeit Zymosan aufzunehmen wieder zurückgewonnen.

An dieser Stelle soll die zweite Aktivität in Erinnerung gerufen werden, welche Prostacyclin bzw. Thromboxan A_2 in Thrombozyten bewirken: die Freisetzung, bzw. Bindung des zur Aggregation notwendigen Calciums.

Sowohl Thrombozyten, als auch Makrophagen verfügen über Aktin und Myosin (73,144,145) und es können daraus ähnliche Actomyosinkomplexe gebildet

werden, wie in Skelettmuskeln, welche ebenfalls eine Ca^{++}-aktivierte ATPase enthalten. Wahrscheinlich bilden diese Aktomyosinkomplexe die für die amöboide Bewegung, Endozytose, Exozytose und viele andere Prozesse notwendigen Mikrofilamente. Eine Steigerung der Phagozytose durch Ca^{++}-Ionen konnte unter anderem in Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (146).

Beide Zelltypen sind demnach Ca^{++}-sensitiv. In Thrombozyten löst Calcium die Aggregation aus, in Makrophagen stimuliert Calcium die Endozytose. In Thrombozyten wird diese Reaktion durch Thromboxan A_2 via Hemmung der Adenylcyclase induziert. Das Gegenteil wird erreicht durch den Einfluss von Prostacyclin: cyclo-AMP wird vermehrt gebildet, Ca^{++} in Chelatkomplexen fixiert, die Aggregation wird verhindert.

Bei beiden Zelltypen stimuliert $PGE_{1(2)}$ die Adenylcyclase, Prostacyclin erwies sich bei Thrombozyten in dieser Hinsicht als bislang aktivste Substanz.

Führt man die Spekulation über Parallelen zwischen Thrombozyten und Makrophagen weiter, so bietet sich folgende Hypothese an: auch in Makrophagen wird durch Erhöhung des Spiegels von cAMP ein Vorgang ausgelöst, welcher eine Ca^{++}-Fixierung zur Folge hat und damit Funktionen lahmlegt, die von der Kontraktion mikrofibrillärer Strukturen abhängig sind, u.a. wird die Phagozytose unterbunden.

Prostacyclin ist die Substanz, welche unter physiologischen Bedingungen einen hemmenden, Thromboxan A_2 jene, welche einen stimulierenden Einfluss auf diese Prozesse nimmt. Das jeweilige Verhältnis von PGI_2 und TxA_2 lenkt die zelluläre Aktivität in die eine oder andere Richtung.

Von anderen in unserem Institut unternommenen Versuchen mit Makrophagen konnte eine Stimulation der Thromboxansynthese während der Phagozytose von Zymosan festgestellt werden (147). Die Ursache der Nichtdetektierbarkeit von Thromboxan B_2 in der von mir beschriebenen Versuchsanordnung

ist bisher unbekannt. Die Wirkung von PGE_1 auf die Synthese von Thromboxan A_2 wäre jedoch von grösstem Interesse, bedenkt man, dass TxA_2 und PGI_2 in der Regulation der Thrombozytenaggregation die direkten Gegenspieler sind.
In diesem Zusammenhang scheint es vielversprechend, die Bestätigung für diese Vermutungen in den Experimenten zu suchen, die mit Makrophagen aus toleranten bzw. hypersensiblen Mäusen durchgeführt wurden. Makrophagen aus toleranten Tieren sind in weit höherem Mass in der Lage Zymosanpartikel zu phagozytieren als solche aus unbehandelten Mäusen. Makrophagen aus hyperreaktiven Mäusen sind zu einer Aufnahme von Zymosan fast überhaupt nicht mehr fähig. Sollte nun wie oben vermutet, das Gleichgewicht zwischen Thromboxan A_2 und Prostacyclin eine physiologische Kontrolle der Phagozytose darstellen, so sollte das Verhältnis dieser beiden Substanzen während der Aufnahme von Zymosan in toleranten Makrophagen gerade umgekehrt sein wie in hyperreaktiven Makrophagen.
Wie die Versuche mit Makrophagen aus vorbehandelten Mäusen zeigen, ändert die LPS-Vorbehandlung der Tiere sowohl den Funktionszustand (Phagozytose) als auch die Induzierbarkeit der Prostaglandinsynthese der Makrophagen mit verschiedenen Stimulantien. Das beschriebene Versuchsmodell gibt somit nicht nur Auskunft über die Vermittlung von LPS-Letalität, es stellt auch ein geeignetes System zur Untersuchung der physiologischen Kontrolle der Phagozytose von Makrophagen dar und bietet die Möglichkeit LPS-Effekte zu modulieren und auf zellulärer und molekularer Basis zu studieren. Es könnte damit einen Beitrag leisten, Endotoxine kontrolliert einzusetzen, sodass dessen erwünschte Wirkungen auch therapeutisch genutzt werden können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Westphal, O.
   Transact. Colleg. Int. Allerg. 10. Symp. Copenhagen 1974
   Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 49, 1

2. Winter, R.
   Pharmacie 2, 512; Pharmacie 5, 131 (1950)

3. Morgan, H.R.
   J. Immunology 41, 161 (1941)

4. Coley, W.B.
   Am. J. Sci. 105, 487 (1893)

5. Johnson, A.G.
   in Bacterial Endotoxins S. 272 (1967)
   ed. M. Landy and W. Braun (Rutgers University Press New Brunswick)
   Proc. Symp. Rutgers University Inst. of Microbiology

6. Möller, G., J. Anderson, O. Sjöberg
   Cell. Immunol. 4, 416 (1972)

7. Pillemer et al.
   Science 122, 545 (1955)

8. Morley, J.
   Prostaglandins 8, 315 (1974)

9. Heilmeyer
   Dt. med. Wschr. 82, 664 (1957)
   Dt. med. Wschr. 82, 683 (1957)

10. Morrison, D.C. and R.C. Ulevitch
    Am. J. Path. 93 (1978)

11. Menkin, V.
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 4, 131 (1953)

12. Vane, J.R.
Nature 231, 232 (1971)

13. Nalbandian, R.M., R.L. Henry
in: Seminar in Thrombosis and Hemostasis 5, 2 (1978)

14. Vogt, W.
in: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research Vol. 3 ed. by C. Gally et al.
Raven Press New York

15. Flower, R.J. and G.J. Blackwell
Biochem. Pharm. 25, 285 (1976)

16. Humes, J.L., R.J. Bonney, L. Pelus, M.W. Dahlgren, S.J. Sadowski, F.A. Kuehl, P. Davis
Nature 269, 149 (1977)

17. Samuelsson, B., E. Granström, K. Green and M. Hamberg
Ann. N.Y. Acad. Sci. 180, 140 (1971)

18. Samuelsson, B., E. Granström, K. Green, M. Bergström, S. Hammarström
Ann. Rev. Biochem. 44, 669 (1975)

19. Morell, R.M.
in: Cell Membrane Receptors for Viruses, Antigens, and Antibodies, Polypeptide Hormones and Small Molecules (1976)
ed. R.F. Beers and E.G. Basset
Raven Press New York

20. Horton, E.W. and J.H.M. Main
Br. J. Pharmacol. Chemotherap. 21, 182 (1963)

21. Yalow, R.S. and S.A. Berson
J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)

22. Binoux, M.A. and W.D. Odell
J. Endocrinol. 36, 303 (1973)

23. Herbert, V., C.W. Gottlieb, K.S. Lan, S.J. Bleicher
J. Endocrinol. 25, 1375

24. Palmieri, G.M.A., R.S. Yalow, S.A. Berson
Horm. Metab. Res. 3, 301 (1971)

25. Lübke, K. und B. Nieuweboer
Immunologische Tests für niedermolekulare Wirkstoffe
G. Thieme Verlag 1978

26. Fröhlich, J.C.
Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research Vol. 5 "Methods in Prostaglandin Research"
Raven Press New York 1978

27. Granström, E.
in: J.C. Fröhlich (26) S. 134

28. Caldwell, B., S. Burstein, W. Brock, L. Speroff
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 171 (1971)

29. Bergström, S. and J. Sjövall
Acta chem. Scand. 14, 1693 (1960)
14, 1963 (1960)

30. Bergström, S., R. Ryhage, B. Samuelsson, J. Sjövall
Acta chem. Scand. 16, 501 (1962)

31. Bergström, S., R. Ryhage, B. Samuelsson, and J. Sjövall
J. Biol. Chem. 238, 3555 (1963)

32. Hamberg, M.
BBRC 61, 942 (1974)

33. Granström, E.
J. Biol. Chem. 243, 4104

34. Granström, E.
Eur. J. Biochem. 27, 462 (1972)

35. Hamberg, M.
Anal. Biochem. 55, 368 (1973)

36. Hamberg, M. and B. Samuelsson
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 899 (1973)

37. Hamberg, M. and B. Samuelsson
Proc. Natl. Acad. Sci USA 71, 3400 (1974)

38. Hamberg, M., J. Svensson, B. Samuelsson
Proc. Natl. Acad. Sci USA 71, 3824 (1974)

39. Hamberg, M., J. Svensson, T. Wakabayashi, B. Samuelsson
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 345 (1974)

40. Nugteren, D.H.
J. Biol. Chem. 250, 2808 (1975)

41. Pace-Asciak, C.R.
BBA 487, 400 (1977)

42. Taylor, P.L.
Nature 250, 667 (1974)

43. Taylor, P.L.
FEBS Lett. 57, 22

44. Powell, W.S.
J. Biol. Chem. 253, 6711 (1978)

45. Samuelsson, B., M. Hamberg, C.C. Sweeley
Anal. Biochem. 38, 301 (1970)

46. Jouvenaz, G.H., D.H. Nugteren, D.A. van Dorp
Prostaglandins 3, 175 (1973)

47. Fritzpatrick, F.A.
in: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research Vol. 5
ed. by J.C. Fröhlich
Raven Press New York

48. Maclouf, J., M. Rigaud, J. Durand, P. Chebroux
Prostaglandins 11, 999 (1976)

49. Dey, P.K., W. Feldberg, K.P. Gupta, S. Wendtlandt
J. Physiol. 253, 103 (1975)

50. Skarnes, R.C., M.J.K. Harper
Prostaglandins 1, 191 (1972)

51. Harper, M.J.K., G. Valenzuela, B.J. Hodgson
Prostaglandins 15, 43 (1973)

52. Anderson, F.L., W. Jubiz, A.C. Kralios, T.O. Tsagaris, H. Kuida
Circulation 46, Suppl. II, 124 (1972)

53. Feldberg, W.
Proc. R. Soc. Lond. B. 191, 199 (1974)

54. Braude, A.I., F.G. Carey, M. Zaleski
J. clin. Invest. 39, 859 (1955)

55. Rowley, D.
Lancet 1, 366 (1956)

56. Fine, J., S.H. Rutenberg and F.B. Schweinburg
J. Exp. Med. 110, 547 (1959)

57. Rutenberg, S.H., F.B. Schweinburg, F. Fine
J. Exp. Med. 112, 801 (1960)

58. Agarwal, M.K., M. Parant, F. Parant
Br. J. exp. Path. 53, 48 (1972)

59. Glode, M., S.E. Mergenhagen, D.L. Rosenstreich
Inf. Immun. 14, 626 (1976)

60. Rosenstreich, D.L., Glode, M., L.M. Wahl, A.L. Sandberg, S.E. Mergenhagen
in: Microbiology - 1977 (ed. D. Schlessinger)
Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

61. Bennet, W.E. and Z.A. Cohn
J. Exp. Med. 123, 145 (1965)

62. Allison, A.C., P. Davies, R.C. Page
J. Inf. Dis. 128, 212 (1973)

63. Cranston, W.J.
Fed. Proc. 38, 49 (1979)

64. Wahl, L.M., S.M. Wahl, S.E. Mergenhagen, G.R. Martin
Proc. Natl. Acad. Sci USA 71, 3589 (1976)

65. Wahl, L.M., L.E. Olsen, A.L. Sandberg, S.E. Mergenhagen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4955 (1977)

66. Kurland, J. and M.A.S. Moore
Exp. Hematol. 5, 357 (1977)

67. Rietschel, E.Th., S. Hase, M.T. King, J. Redmond and V. Lehmann
in: Microbiology - 1977, 262 D. Schlessinger (ed.)
Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

68. McIntire, F., M.P. Hargie, J.R. Schenck, R.A. Finley, H.W. Sievert, E.Th. Rietschel, D.L. Rosenstreich
J. Immunol. 117, 674 (1976)

69. Siegert, R., W.K. Philipp-Dormston, K. Radsak and K. Menzel
Infect. Immun. 14, 1130 (1976)

70. Galanos, C., E.Th. Rietschel, O. Lüderitz, O. Westphal, Y.B. Kim. D.W. Watson
Eur. J. Biochem. 31, 230 (1972)

71. Wahl, L.M., D.L. Rosenstreich, L.M. Glode, A.L. Sandberg, and S.E. Mergenhagen
Infect. Immun. 23, 8 (1979)

72. Westphal, O., O. Lüderitz, F. Bister
Z. Naturforschung 7b, 148 (1952)

73. Galanos, C., O. Lüderitz, O. Westphal
Eur. J. Biochem. 9, 245 (1969)

74. Galanos, C. and O. Lüderitz
Eur. J. Biochem. 54, 603 (1975)

75. Oropeza-Rendon, R.L., V. Speth, G. Hiller, K. Weber and H. Fischer
Exp. Cell Res. 119, 365 (1979)

76. Greer, G.G. and E.Th. Rietschel
Infect. Immun. 20, 366 (1978)

77. Meerpohl, H.G., M.L. Lohmann-Matthes, H. Fischer
Eur. J. Immunol. 6, 213 (1976)

78. Bergmeyer, U.
in: Methoden der enzymatischen Analyse S. 533
ed. H.U. Bergmeyer
Verlag Chemie

79. Breiter, J., R. Helger, H. Lang
Diagnostica Merck
GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium Juli 1977

80. Jaffe, B.M., H.R. Behrmann, C.W. Parker
J. Clin. Invest. 52, 398 (1973)

81. Ånggard, E., H. Bergkrist
J. Chromatog. 48, 542 (1970)

82. Grob, K. and G. Grob
Chromatographia 5, 3 (1973)

83. Grob, K. and G. Grob
J. Chromatogr. 94, 53 (1974)

84. Van den Berg and Th. P.H. Cox
Chromatographia 5, 301 (1972)

85. Schomburg, G.
Gaschromatographie S. 18
Taschentext 48 Verlag Chemie, Weinheim 1977

86. Schomburg, G.
ibid S. 19

87. Kovats, E.
in: Adv. in Chromatogr. Vol. 1
Ed.: J.C. Giddings, R.A. Keller
Marcel Dekker New York

88. Peskar, B.A., H. Anhut, E.E. Kröner, and B.M. Peskar
in: Advances in Pharmocology and Therapeutics Vol. 7
Ed. by J.P. Tillement
Pergamon Press Oxford and New York (1979)

89. Diekmann, J.M., A. Jobke, B.A. Peskar, G. Hertting
N.S. Arch. Pharmacol. 297, 177 (1977)

90. Raffel, G., P. Clarenbach, B.A. Peskar, and G. Hertting
J. Neurochem. 26, 493 (1976)

91. Liebig, R., W. Bernauer, B.A. Peskar
N.S. Arch. Pharmacol. 284, 279

92. Jobke, A., B.A. Peskar, B.M. Peskar
FEBS Lett. 37, 192 (1973)

93. Shands, J.W., D.L. Peavy, B.J. Gormens and J.McGraw
Infect. Immun. 9, 106 (1974)

94. Flower, R.J.
Pharmacol. Reviews (1974)
Vol. 26, 33

95. Rosenstreich, D.L. and L.M. Glode
J. Immunol. 115, 777 (1975)

96. Allison, A.C.
in: Locomotion of Tissue Cells
Ciba Symposium 14 S. 109
Elsevier Publishing Company

97. VanFurth, R.
Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology (1975)
Blackwell Sci.

98. Domzig, W.
Dissertation S. 47
Freiburg 1979

99. Sultzer, B.M.
Nature 219, 1253 (1968)

100. Sultzer, B.M.
Infect. Immun. 5, 107 (1972)

101. Skidmore, B.J., J.M. Chiller, D.C. Morrison and W.O. Weigle
J. Immunol. 114, 770 (1975)

102. Watson, J.
J. Exp. Med. 141, 97 (1975)

103. Glode, L.M., A. Jacques, S.E. Mergenhagen and D.L. Rosenstreich
J. Immunol. 119, (1977)

104. Skidmore, B.J., J.M. Chiller, W.O. Weigle, R. Riblet and J.T. Watson
J. Exp. Med. 143, 143 (1976)

105. Glode, L.M., J. Scher, B. Osborne and D.L. Rosenstreich
J. Immunol. 116, 454 (1976)

106. Lüderitz, O., C. Galanos, V. Lehmann, H. Mayer, E.Th. Rietschel and J. Weckesser
Naturwissenschaften 65, 578 (1978)

107. Melchers, F., V. Braun and C. Galanos
J. Exp. Med. 142, 473 (1975)

108. Sultzer, B.M. and G.W. Goodman
in: Microbiology - 1977, S. 304
(ed. D. Schlessinger)
Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

109. Morrison, D.C., S.J. Betz and D.M. Jacobs
J. Exp. Med. 144, 840 (1976)

110. Gordon, S., J.C. Unkeless, Z.A. Cohn
J. Exp. Med. 140, 995 (1974)

111. Werb, Z., J.T. Dingle
in: Lysosomes in Biology and Pathology
Ed.: J.T. Dingle, R.T. Dean 5, 127 (1976)
Elsevier New York

112. Ferraris, V.A., F.R. deRobertis
J. clin. Invest. 54, 378 (1974)

113. Bauminger, S.
Prostaglandins 16, 351 (1978)

114. McCall, E., Y.S.F. Youlten
Pol. J. Pharmacol. Pharm. 26, 37 (1974)

115. Goldstein, J.M., C.C. Malmsten, H. Knidahl, H.B. Kaplan, O. Radmark, B. Samuelsson, G. Weissmann
J. Exp. Med. 148, 787 (1978)

116. Kurland, J.J., P.W. Kincade, M.A.S. Moore
J. Exp. Med. 146, 1420 (1977)

117. Broxmeyer, H.E. and M.A.S. Moore
BBA 516, 129 (1978)

118. Hensby, C.
in: Organic Chemistry Vol. 36, 89 (1977)
Prostaglandin Research, ed. by P. Crabbé
Academic Press New York

119. Fitzpatrick, F.A.
Anal. Chem. 50, 47 (1978)

120. Melmon, K.L., H.R. Bourne, Y. Weinstein, G.M. Shearer, J. Kram, S. Bauminger
J. clin. Invest. 53, 13 (1974)

121. Stockman, G.D. and D.M. Manford
Exp. Hemat. 2, 65 (1974)

122. Morley, J., M.A. Bray and D. Gordon
Bayer Symposium VI
Experimental Models of Chronic Inflammatroy Deseases 376 (1977)
by Springer Verlag

123. Gemsa, D., L. Steggemann, G. Till, Klaus Resch
J. Immunol. 119, 524 (1977)

124. Donike, M.
Chromatographia 6, 190 (1973)

125. Myatt, L., D. Gordon, J. Morley
Nature 257, 227 (1975)

126. Couthinho, A., E. Gronowicz, W. Bullock, G. Möller
J. Exp. Med. 139, 74 (1974)

127. Feldmann, F., A. Basten
J. Exp. Med. 134, 103 (1971)

128. Kurland, J.J., and R. Bockman
J. Exp. Med. 147, 952 (1978)

129. Schade, U., H. Fischer, M.L. Lohmann-Matthes, B. Peskar and E.Th. Rietschel
Abstract No. 105
4th European Immunology Meeting Budapest 1978

130. Hämmerling, U. and O. Westphal
Eur. J. Biochem. 1, 46 (1967)

131. Benedetto, D.A., J.W. Shands Jr., D.O. Shah
BBA 298, 145 (1973)

132. Schuster, B.G., R.F. Palmer and R.S. Aronson
J. Membran. Biol. 3, 67 (1970)

133. Kotaka, T., K. Inone, O. Lüderitz and S.C. Kinsky
Eur. J. Biochem. 21, 80 (1971)

134. Romeo, D., A. Girard and L. Rothfield
J. Mol. Biol. 53, 475 (1970)

135. Springer, G.F., E.T. Wang, J.H. Nichols, J.M. Shear
Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 133, 566 (1966)

136. Springer, G.F. and J.C. Adye
Infect. Immun. 12, 978 (1975)

137. Davis, M., D.E.S. Stewart-Thel and D.M. Jackson
BBA 508, 260 (1978)

138. Malkison, A.M.
Wirkungsmechanismen der Hormone
G. Fischer Verlag Stuttgart, New York

139. Hamberg, M., J. Svensson, B. Samuelsson
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2994 (1975)

140. Moncada, S., R. Gryelewski, S. Bunting, J.R. Vane
Nature 263, 663 (1976)

141. Moncada, S., J.R. Vane, E.A. Higgs
Lancet 1, 18 (1977)

142. Gemsa, D., L. Steggemann, J. Menzel and G. Till
J. Immunol. 114, 1422 (1975)

143. DeRobertis, E.D.P., F.A. Saez, E.M.F. DeRobertis Jr.
in: Cell Biology 6th Edition 497 (1975)

144. Stossel, T.P., and J.W. Hartwig
in: Mononuclear Phagocytes 533
ed. Ralph van Furth
Blackwell Sci. Publications
Oxford, London, Edinburgh, Melbourne

145. Stossel, T.P.,
J. Cell. Biol. 58, 346 (1973)

146. Weidemann, M.J. K. Wrogemann, E.Th. Rietschel, H.J. Staudinger and H. Fischer
FEBS Letters 89, 136 (1978)

147. Galanos, C.
Z. Immun.-Forsch. 149, 214 (1975)

148. Rietschel, E.Th., C. Galanos, and O. Lüderitz
in: D. Schlessinger (ed.) Microbiology 1975 S. 307
Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

149. Peskar, B.A.
Persönliche Mitteilung (1978)

150. Westphal, O.
Persönliche Mitteilung (1978)

Lebenslauf

30.3.1950	geboren als Sohn des Zahnarztes Dr. W. Schade und dessen Frau Helene, geb. Fischer in Rosenfeld/Bad.-Württ.
1956 - 1960	Besuch der Grundschule in Rosenfeld
1960	Umzug nach Rottenburg/Neckar
1960 - 1968	Besuch des Eugen-Bolz-Gymnasiums in Rottenburg
Mai 1968	Reifeprüfung
WS 1968/69- WS 1973/74	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
SS 1971	Vordiplomprüfung Biologie
April 1974	Dimplomprüfung Biologie
Mai 1974- Mai 1975	Diplomarbeit am Institut für chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Doz. Dr. K. Wegmann
Juli 1975- Juni 1976	Wehrdienst bei der Bundeswehr
Okt. 1976	Beförderung zum Gefreiten
Juni 1976- Jan. 1977	Beginn einer Doktorarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Konstanz unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Böger
Feb. 1977-	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg unter der Leitung von Herrn Doz. Dr. E. Th. Rietschel
März 1978	Eheschliessung mit Barbara Lode